

MÉTODOS DE USO DE UNA CONSTRUCCIÓN BIESPECÍFICA DE UNIÓN AL ANTÍGENO DIRIGIDA A HER2 PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCERES DE LAS VÍAS BILIARES

LISTADO DE SECUENCIAS

5 La presente solicitud contiene un Listado de secuencias que se presentará a través de EFS-Web y se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Dicha copia de ASCII, creada el 31 de mayo de 2019, se denomina ZWI063sequencelisting.txt y tiene un tamaño de 99 000 bytes.

ANTECEDENTES

10 Los cánceres de las vías biliares (BTC), que incluyen el cáncer de la vesícula biliar y el colangiocarcinoma, son neoplasias malignas poco comunes con pronóstico precario. La incidencia anual estimada es de 10 650 casos en los Estados Unidos (Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2014;64(1):9-29). La
15 mayoría de los BTC se diagnostican en una etapa avanzada, y solo alrededor de 25 % son operables. La tasa de supervivencia global a 5 años es inferior a 10 % (Anderson CD, Pinson CW, Berlin J, Chari RS. Diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. Oncologist. 2004;9(1):43-57; de Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, Gunderson LL, Nagorney DM. Biliary Tract Cancers. N Engl J Med. 1999;341(18):1368-78). HER2 se sobreexpresa en 3-
20 25 % de los cánceres biliares (Benavides M, Antón A, Gallego J, Gómez MA, Jiménez-Gordo A, La Casta A, et ál. Biliary tract cancers: SEOM clinical guidelines. Clinical and Translational Oncology. 2015;17(12):982-7).

Las opciones de tratamiento de primera línea para los BTC no operables incluyen quimioterapia sistémica (gemcitabina con cisplatino, que mejora la supervivencia total en comparación con
25 gemcitabina sola [11.7 meses frente a 8.1 meses, respectivamente]). Los tratamientos alternativos de primera línea incluyen el pembrolizumab para tumores MSI-H/dMMR, quimiorradiación basada en fluoropirimidina, radioterapia sin quimioterapia adicional, agentes en investigación, o el mejor cuidado complementario. Existe una falta de evidencia de respaldo para la quimioterapia de segunda línea en el BTC y se recomiendan ensayos clínicos (NCCN Clinical
30 Practice Guidelines: Hepatobiliary Cancers. Versión 2.2019).

Aún existe una necesidad de tratamiento para los cánceres de las vías biliares.

La publicación internacional de patente n.º WO2015/077891 describe anti-HER2 biespecíficos dirigidos contra dos epítomos de HER2 distintos en ECD4 y ECD2, los mismos epítomos que se unen a trastuzumab y pertuzumab.

COMPENDIO

En la presente se describen métodos de uso de una construcción biespecífica de unión al

antígeno dirigida a HER2 para el tratamiento de cánceres de las vías biliares. En un aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer de las vías biliares (BTC), que comprende administrar una cantidad eficaz de una construcción de unión al antígeno anti-HER2 o un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) al sujeto.

- 5 En algunas modalidades, el BTC es extirpable, parcialmente extirpable o no extirpable.
En algunas modalidades, el BTC está avanzado.
En algunas modalidades, el BTC es HER2 3+, HER2 2+ o HER2 1+, según se mide mediante inmunohistoquímica (IHC) y tiene amplificación de genes.
En algunas modalidades, el BTC es HER2 3+, HER2 2+ o HER2 1+, según se mide mediante
- 10 inmunohistoquímica (IHC), sin amplificación de genes HER2.
En algunas modalidades, el BTC es cáncer de vesícula biliar.
En algunas modalidades, el BTC es colangiocarcinoma (CCA).
En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una cadena pesada H1, una cadena pesada H2, y una cadena ligera L1, en donde: a) una cadena
- 15 pesada H1 comprende las secuencias de CDR indicadas en la SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, y SEQ ID NO:41; b) la cadena pesada H2 comprende las secuencias de CDR indicadas en la SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, y SEQ ID NO:72; y c) la cadena ligera L1 comprende las secuencias de CDR indicadas en la SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, y SEQ ID NO:29.
- 20 En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una cadena pesada H1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:36, una cadena pesada H2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:63, y una cadena ligera L1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24.
- 25 En algunas modalidades, la cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es de 10 mg/kg por semana.
En algunas modalidades, la cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es de 20 mg/kg cada dos semanas.
- 30 En algunas modalidades, la cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es de 30 mg/kg cada tres semanas.
En algunas modalidades, la administración de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 al sujeto da como resultado una respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR) o enfermedad estable (SD) en el sujeto.
- 35 En algunas modalidades, la tasa de control de la enfermedad en un grupo de sujetos tratados con la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es mayor que 60 %, 70 % u 80 %.
En algunas modalidades, la tasa de respuesta general en un grupo de sujetos tratados con la

construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es mayor que 50 %, 60 %, 70 % u 80 %.

En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 se administra después de al menos una, dos o tres terapias de primera línea.

5 En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 se administra como una monoterapia de primera línea.

En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 se administra como una terapia adyuvante o una terapia neoadyuvante.

10 En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 se administra junto con uno o más agentes quimioterapéuticos.

En algunas modalidades, los uno o más agentes quimioterapéuticos son gemcitabina y/o cisplatino.

15 En otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un uso de una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de las vías biliares (BTC).

En aun otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un uso de una cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC para el tratamiento del BTC en un sujeto.

20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La Figura 1 ilustra una representación de un ejemplo de construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 en un formato Fab/scFv.

La Figura 2 ilustra la duración del tratamiento y la disminución máxima en la suma de diámetros (SOD) en los sujetos que tienen BTC y se trataron con v10000.

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente se describe un método para tratar el cáncer de las vías biliares (BTC) en un sujeto, que comprende administrar una construcción biespecífica de unión al antígeno que se dirige a
 30 HER2 en el paciente. En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno que se dirige a HER2 se enlaza a un análogo de la auristatina (denominado, en la presente, conjugado anticuerpo-fármaco o ADC). En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno que se dirige a HER2 puede usarse en un método para tratar el cáncer de vesícula biliar o el colangiocarcinoma. En otras modalidades, la construcción biespecífica de
 35 unión al antígeno que se dirige a HER2, cuando se administra a un sujeto con BTC, puede dar como resultado una disminución en el tamaño de tumores o lesiones en el sujeto. En aun otras modalidades, la administración de la construcción biespecífica de unión al antígeno que se dirige a HER2 puede dar como resultado una respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR) o una

enfermedad estable (SD) en un sujeto, según se mide mediante las pautas de RECIST 1.1.

En la presente también se describe un método para tratar el BTC, que comprende administrar una construcción biespecífica de unión al antígeno que se dirige a HER2 a un sujeto junto con uno o más agentes quimioterapéuticos.

5

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica.

10 Tal como se usa en la presente, «alrededor de» hace referencia a una variación de aproximadamente $\pm 10\%$ respecto a un valor dado, a menos que se indique de otro modo. Se entenderá que dicha variación se incluye siempre en cualquier valor proporcionado en la presente, ya sea que se haga referencia a ello específicamente o no.

15 Cuando los términos «un» o «una» se utilizan en la presente junto con «que comprende» pueden significar «uno/a», pero también son coherentes, en determinadas modalidades, con el significado de «uno/a o más», «al menos uno/a» y «uno/a o más de uno/a».

20 Tal como se usan en la presente, «que comprende», «que tiene», «que incluye» y «que contiene», y variaciones gramaticales de estas expresiones, son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos y/o etapas de métodos adicionales no mencionados. La expresión «que consiste esencialmente en», cuando se usa en la presente en relación con una composición, uso o método, indica que se pueden encontrar etapas de métodos y/o elementos adicionales presentes, pero que dichas adiciones no afectan materialmente la forma en la que funciona la composición, el método o el uso mencionados. La expresión «que consiste en», cuando se usa en la presente en relación con una composición, uso o método, excluye la presencia de etapas de métodos y/o elementos adicionales. Una composición, uso o método que se describe en la presente como que comprende determinados elementos y/o etapas también puede, en determinadas modalidades, consistir esencialmente en dichos elementos y/o etapas, y en otras modalidades, consistir en dichos elementos y/o etapas, ya sea que se haga referencia específicamente a dichas modalidades o no.

30 Se contempla que es posible implementar cualquiera de las modalidades descritas en la presente con respecto a cualquier método, uso o composición que se describe en la presente.

35 Las características, estructuras y/o elementos particulares que se describen en relación con una modalidad descrita en la presente pueden combinarse con características, estructuras y/o elementos que se describen en relación con otra modalidad descrita en la presente de cualquier manera adecuada para proporcionar una o más modalidades adicionales.

También se entenderá que la mención positiva de un elemento en una modalidad sirve como base para la exclusión del elemento en una modalidad alternativa. Por ejemplo, cuando se presenta una lista de opciones para una modalidad o reivindicación dada, se entenderá que una

o más opciones pueden eliminarse de la lista y la lista abreviada puede formar una modalidad alternativa, ya sea que se haga referencia específicamente a dicha modalidad alternativa o no.

Construcciones biespecíficas de unión al antígeno que se unen a HER2

- 5 A continuación, se describen construcciones biespecíficas de unión al antígeno que se unen a HER2 (también denominadas construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2). La expresión «construcción de unión al antígeno» hace referencia a un agente, por ejemplo, polipéptido o complejo polipeptídico, capaz de unirse a un antígeno. En algunos aspectos, una construcción de unión al antígeno es un polipéptido que se une específicamente a un antígeno
- 10 de interés. Una construcción de unión al antígeno puede ser un monómero, un dímero, un multímero, una proteína, un péptido o un complejo de proteínas o péptidos; un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este; un scFv y similares. Una construcción de unión al antígeno puede ser una construcción de polipéptidos que es monoespecífica, biespecífica o multiespecífica. En algunos aspectos, una construcción de unión
- 15 al antígeno puede incluir, por ejemplo, uno o más componentes de unión al antígeno (por ejemplo, Fab o scFv) unidos a uno o más Fc. A continuación, se describen ejemplos adicionales de construcciones de unión al antígeno y se proporcionan en los Ejemplos. Se pretende que el término «biespecífico» incluya cualquier agente, por ejemplo, una construcción de unión al antígeno, que tiene dos restos de unión al antígeno (por ejemplo,
- 20 construcciones polipeptídicas de unión a antígeno), cada una con una especificidad de unión única. Por ejemplo, un primer resto de unión al antígeno se une a un epítipo en un primer antígeno y un segundo resto de unión al antígeno se une a un epítipo en un segundo antígeno. El término «biparatópico», tal como se usa en la presente, hace referencia a un anticuerpo biespecífico donde el primer resto de unión al antígeno y el segundo resto de unión al antígeno
- 25 se unen a epítopos diferentes en el mismo antígeno. Un anticuerpo biespecífico biparatópico puede unirse a dos epítopos en la misma molécula de antígeno o puede unirse a epítopos en dos moléculas de antígeno diferentes. Una construcción monoespecífica de unión al antígeno hace referencia a una construcción de
- 30 unión al antígeno con una especificidad de unión. En otras palabras, ambos restos de unión al antígeno se unen al mismo epítipo en el mismo antígeno. Los ejemplos de construcciones monoespecíficas de unión al antígeno incluyen trastuzumab y pertuzumab, que se unen a HER2. Una construcción de unión al antígeno puede ser un anticuerpo o una parte de unión al antígeno de este. Tal como se usan en la presente, «anticuerpo» o «inmunoglobulina» hacen referencia a
- 35 un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o por genes de inmunoglobulina, o fragmentos de estos, que se unen específicamente y reconocen un analito (por ejemplo, antígeno). Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como también los innumerables

genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. La «clase» de un anticuerpo o inmunoglobulina hace referencia al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estos pueden dividirse, además, en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada correspondientes a las clases diferentes de inmunoglobulinas se conocen como α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

Un ejemplo de una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) se compone de dos pares de cadenas de polipéptidos, cada par con una cadena «ligera» (alrededor de 25 kD) y una cadena «pesada» (alrededor de 50-70 kD). El dominio del extremo N de cada cadena define una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. Las expresiones «cadena ligera variable» (VL) y «cadena pesada variable» (VH) hacen referencia a dichos dominios de cadena ligera y pesada, respectivamente. La cadena pesada de IgG1 comprende los dominios VH, CH1, CH2 y CH3, respectivamente, del extremo N al C. La cadena ligera comprende los dominios VL y CL del extremo N al C. La cadena pesada de IgG1 comprende una bisagra entre los dominios CH1 y CH2. En determinadas modalidades, las construcciones de inmunoglobulina comprenden al menos un dominio de inmunoglobulina de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE relacionado con un polipéptido terapéutico. En algunas modalidades, el dominio de inmunoglobulina que se encuentra en una construcción de unión al antígeno que se proporciona en la presente es de una construcción a base de inmunoglobulina, tal como un diacuerpo o un nanocuerpo, o deriva de ella. En determinadas modalidades, las construcciones de inmunoglobulina que se describen en la presente comprenden al menos un dominio de inmunoglobulina a partir de un anticuerpo de cadena pesada tal como un anticuerpo de camélido. En determinadas modalidades, las construcciones de inmunoglobulina que se proporcionan en la presente comprenden al menos un dominio de inmunoglobulina de un anticuerpo de mamífero tal como un anticuerpo de bovino, un anticuerpo humano, un anticuerpo de camélido, un anticuerpo de ratón o cualquier anticuerpo quimérico.

Una «región determinante de complementariedad» o «CDR» es una secuencia de aminoácidos que contribuye a la especificidad y afinidad de unión al antígeno. Las regiones «marco» (FR) pueden ayudar a mantener la conformación adecuada de las CDR para fomentar la unión entre la región de unión al antígeno y un antígeno. Desde un punto de vista estructural, las regiones marco pueden ubicarse en anticuerpos entre las CDR. Las regiones variables, típicamente, presentan la misma estructura general que las regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también conocidas como CDR. Las CDR de los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera típicamente están alineadas por las regiones marco, lo que puede permitir la unión a un epítipo específico. Del extremo N al extremo C, los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas comprenden típicamente los dominios FR1,

CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos para cada dominio se hace típicamente de acuerdo con las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), a menos que indique de otro modo. Típicamente, hay tres CDR (o regiones CDR) de cadena pesada y tres de cadena ligera en la parte variable de una inmunoglobulina. Las tres CDR de cadena pesada se denominan en la presente CDRH1, CDRH2 y CDRH3, mientras que las tres CDR de cadena ligera se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Por lo tanto, «CDR», tal como se usa en la presente, puede hacer referencia a las tres CDR de cadena pesada o las tres CDR de cadena ligera (o todas las CDR de cadena pesada y ligera, si corresponde). Las CDR proporcionan la mayoría de los residuos de contacto para la unión del anticuerpo al antígeno o epítipo. A menudo, se requieren las tres CDR de cadena pesada y las tres CDR de cadena ligera para unirse al antígeno. Sin embargo, en algunos casos, incluso un único dominio variable puede conferir especificidad de unión al antígeno. Además, como se conoce en la técnica, en algunos casos, la unión al antígeno también puede producirse mediante una combinación de un mínimo de una o más CDR seleccionadas de los dominios VH y/o VL, por ejemplo, CDRH3.

Son de uso común varias definiciones diferentes de las secuencias de CDR, que incluyen las descritas por Kabat et ál. (1983, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, publicación de NIH n.º 369-847, Bethesda, MD), por Chothia et ál. (1987, *J Mol Biol*, 196:901-917), así como las definiciones de IMGT, AbM (University of Bath) y Contact (MacCallum R. M., y Martin A. C. R. y Thornton J. M, (1996), *Journal of Molecular Biology*, 262 (5), 732-745). A modo de ejemplo, las definiciones de CDR de acuerdo con Kabat, Chothia, IMGT, AbM y Contact se proporcionan en la Tabla 1, a continuación. Por consiguiente, como resultará fácilmente evidente para un experto en la técnica, la numeración y la ubicación exactas de las CDR pueden diferir en función del sistema de numeración empleado. Sin embargo, se entenderá que la descripción en la presente de un VH incluye la descripción de las CDR de cadena pesada (HCDR) asociadas (inherentes), tal como definen cualquiera de los sistemas de numeración conocidos. De forma similar, la descripción en la presente de un VL incluye la descripción de las CDR de cadena ligera (LCDR) asociadas (inherentes), tal como definen cualquiera de los sistemas de numeración conocidos.

Tabla 1: Definiciones comunes de CDR¹

Definición	Cadena pesada			Cadena ligera		
	CDR1 ²	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	H31-H35B	H50-H65	H95-H102	L24-L34	L50-L56	L89-L97
Chothia	H26-H32, H33 o H34	H52-H56	H95-H102	L24-L34	L50-L56	L89-L97
IMGT	H26-H33, H34, H35,	H51-H57	H93-H102	L27-L32	L50-L52	L89-L97

Definición	Cadena pesada			Cadena ligera		
	CDR1 ²	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
	H35A o H35B					
AbM	H26-H35B	H50-H58	H95-H102	L24-L34	L50-L56	L89-L97
Contact	H30-H35B	H47-H58	H93-H101	L30-L36	L46-L55	L89-L96

¹ Se puede utilizar el sistema de numeración de Kabat o Chothia para HCDR2, HCDR3 y las CDR de cadena ligera para todas las definiciones, excepto Contact, que utiliza la numeración de Chothia.

² Se usa la numeración de Kabat. La posición en el esquema de numeración de Kabat que demarca el final del bucle CDR-H1 de Chothia e IMGT varía dependiendo de la longitud del bucle porque Kabat coloca inserciones fuera de esas definiciones de CDR en las posiciones 35A y 35B. Sin embargo, el bucle CDR-H1 de IMGT y Chothia puede definirse sin ambigüedades mediante el uso de la numeración de Chothia. Definiciones de CDR-H1 que usan la numeración de Chothia: Kabat H31-H35, Chothia H26-H32, AbM H26-H35, IMGT H26-H33, Contact H30-H35.

Tal como se usa en la presente, la expresión «cadena simple» hace referencia a una molécula que comprende monómeros de aminoácidos enlazados de forma lineal mediante enlaces peptídicos. En determinadas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno es una molécula Fv de cadena simple (scFv). Tal como se describió con mayor detalle en la presente, un scFv tiene un dominio variable de cadena ligera (VL) conectado desde su extremo C al extremo N de un dominio variable de cadena pesada (VH) mediante una cadena polipeptídica. Alternativamente, el scFv puede tener una cadena polipeptídica en donde el extremo C de VH está conectado al extremo N de VL mediante una cadena polipeptídica.

Construcción polipeptídica de unión al antígeno

La construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende dos construcciones polipeptídicas de unión al antígeno, donde cada una se une específicamente a un dominio o epítipo de HER2 particular. En una modalidad, cada construcción polipeptídica de unión al antígeno se une a un dominio extracelular de HER2, por ejemplo, ECD2 o ECD4. La construcción polipeptídica de unión al antígeno puede ser, por ejemplo, un Fab o un scFv, dependiendo de la aplicación.

El formato de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 determina las características funcionales de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2. En una modalidad, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 tiene un formato scFv-Fab (es decir, una construcción polipeptídica de unión al antígeno es un scFv y la otra construcción polipeptídica de unión al antígeno es un Fab, también denominado formato Fab-

scFv). En otra modalidad, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 tiene un formato scFv-scFv (es decir, ambas construcciones polipeptídicas de unión al antígeno son scFv).

El «fragmento Fab» (también denominado fragmento de unión al antígeno) contiene el dominio constante (CL) de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada junto con los dominios variables VL y VH en las cadenas ligera y pesada, respectivamente. Los dominios variables comprenden los bucles determinantes de complementariedad (CDR, que también se denominan región hipervariable) que están involucrados en la unión al antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio de cadena pesada CH1 que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo.

El «Fv de cadena simple» o «scFv» incluye los dominios VH y VL de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena simple de polipéptidos. En una modalidad, el polipéptido Fv también comprende adicionalmente un enlace de polipéptido entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígenos. Para acceder a una revisión de scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994). Los fragmentos scFv del anticuerpo HER2 se describen en WO93/16185; patente estadounidense n.º 5,571,894; y patente estadounidense n.º 5,587,458.

Formato y función de las construcciones de unión al antígeno

En la presente se proporcionan construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 que tienen dos construcciones polipeptídicas de unión al antígeno, las primeras se unen específicamente a HER2 ECD2 y las segundas se unen específicamente a HER2 ECD4. El formato de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es tal que al menos uno del primer o del segundo polipéptido de unión al antígeno es un scFv. El formato de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 puede ser scFv-scFv, o Fab-scFv o scFv-Fab (primera construcción polipeptídica de unión al antígeno-segundo polipéptido de unión al antígeno, respectivamente).

En determinadas modalidades, las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 muestran actividades antitumorales *in vitro*, tales como (i) la capacidad de inhibir el crecimiento de las células cancerosas en presencia y ausencia de la estimulación mediante el factor de crecimiento epidérmico o heregulina, (ii) la capacidad de internalizarse en células cancerosas (a través de la unión a antígenos HER2 y haciendo que este se internalice) y (iii) la capacidad de mediar la eliminación de células efectoras dirigidas por anticuerpos (ADCC). Estas actividades *in vitro* se observan en construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 sin conjugarse y en la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 conjugada con un

análogo de auristatina y con varios niveles de expresión de HER2 (1+, 2+ y 3+).

El formato (scFv/scFv, scFv/Fab o Fab/Fab) de las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 es importante para determinar su perfil funcional, tal como se describe en la publicación internacional de patente n.º WO2015/077891. En determinadas modalidades, las construcciones de unión a anti-HER2 muestran una mayor capacidad de ser internalizadas por células tumorales que expresan HER2 en comparación con una construcción de unión al antígeno de referencia en la cual ambas construcciones polipeptídicas de unión a ECD2 y ECD4 son Fab. Se contempla que el grado de internalización de las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 pueden mejorarse adicionalmente al aumentar la afinidad de una o ambas construcciones polipeptídicas de unión a antígenos para ECD2 o ECD4. En una modalidad en la que el polipéptido de unión a ECD2 es un Fab y el polipéptido de unión a ECD4 es un scFv, la construcción se internaliza en mayor medida en comparación con construcciones de afinidad equivalente que tienen un formato Fab/Fab, y se internalizado en una medida similar que las construcciones de afinidad equivalente que tienen un formato scFv/scFv, mediante células tumorales con expresión de HER2 alta y baja. Las modalidades que se internalizan fácilmente son buenas candidatas para los conjugados anticuerpo-fármaco, que requieren la internalización por parte de una célula tumoral para efectuar la eliminación. Por otra parte, en determinadas modalidades, las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2, que no se internalizan fácilmente, muestran una mayor potencia en la eliminación de ADCC de células tumorales que expresan bajos niveles de HER2 en comparación con construcciones de afinidad equivalente que tienen un formato Fab/Fab. En una modalidad, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 que tiene un formato Fab/scFv es más potente en la eliminación de ADCC de las células tumorales que expresan bajos niveles de HER2 (HER2 0-1+ o 1+) que una construcción anti-HER2 que tiene un formato Fab/Fab, que, a su vez, es más potente que una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 con un formato scFv/scFv. La mayor potencia de ADCC de algunas modalidades puede deberse a 1) su mayor capacidad para unirse ávidamente a células con baja densidad del receptor HER2 y, posteriormente, agrupar el receptor HER2 en la superficie de la célula diana, y mediar la eliminación mediada por células posterior; y/o 2) su mayor capacidad para permanecer en la superficie celular (en vez de provocar la internalización), por lo tanto, se encuentran más disponibles para la eliminación efectora mediada por células.

HER2

Las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 descritas en la presente comprenden construcciones polipeptídicas de unión al antígeno que se unen a ECD2 y ECD4 de HER2.

Las expresiones «ErbB2» y «HER2» se usan de forma indistinta en la presente y hacen

referencia a una proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba et ál., *PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto et ál. *Nature* 319:230-234 (1986) (número de registro en Genbank X03363). Los términos «erbB2» y «neu» hacen referencia al gen que codifica la proteína ErbB2 humana. p185 o p185neu hacen referencia al producto de proteína del gen neu.

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

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

La secuencia de HER2 es de la siguiente manera: los límites de ECD son el Dominio I: 1-165; Dominio II: 166-322; Dominio III: 323-488; Dominio IV: 489-607.
20

```

1 tqvctgtdmk lrlpaspeth ldmlrhlyqg cqvvqgnlel tylptnasls flqdiqevqg
61 yvliahnqvr qvplqlriv rgtqlfedny alavldngdp lnnttpvtga spggrlrelql
121 rslteilkkg vliqrnpqlc yqdtilwkdi fhknnqlalt lidtnrsrac hpcspmkkg
181 rcwgessedc qsltrtvacg gcarckgplp tdccheqcaa gctgpkhsdc lachfnhsg
25 241 icelhcpalv tyntdtfesm pnpegrytfg ascvtacpyn ylstdvgsct lvcplhnqev
301 taedgtqrce kcskpcarvc yglgmehltre vravtsaniq efagckkifg slaflpesfd
361 gdpasntapl qpeqlqvfet leeitgylyi sawpdsldpl svfqnlqvtr grillhngays
421 ltlqglgisw lglrlsrelg sglalihhnt hlcfvhtvpw dqftrnphqa llhtanrped
30 481 ecvgeglach qlcarghchw pgptqcvncs qflrgqecve ecrvlqglpr eyvna rhclp
541 chpecqpqng svctfgpead qcvacahykd pffcvarcps gvkpdlsymp iwkfpdeega
601 cqpcpin (SEQ ID NO:1)

```

El «epítipo 2C4» es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo
35 2C4. El epítipo 2C4 comprende residuos del dominio II en el dominio extracelular de HER2. 2C4 y Pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en la unión de los dominios I, II y III. Franklin et ál. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004). Puede llevarse a cabo un ensayo de bloqueo cruzado de rutina con el fin de determinar los anticuerpos que se unen al epítipo 2C4, tal como

se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). De manera alternativa, puede realizarse un mapeo de epítomos para evaluar si el anticuerpo se une al epítomo 2C4 del HER2 mediante el uso de métodos conocidos en la técnica y/o puede estudiarse la estructura del anticuerpo HER2 (Franklin et ál. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)) para ver qué dominio/s de HER2 se une/n al anticuerpo.

El «epítomo 4D5» es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y Trastuzumab. Este epítomo se encuentra cerca del dominio transmembrana de HER2 y dentro del Dominio IV de HER2. Puede llevarse a cabo un ensayo de bloqueo cruzado de rutina con el fin de determinar los anticuerpos que se unen al epítomo 4D5, tal como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). De manera alternativa, puede realizarse un mapeo de epítomos para evaluar si el anticuerpo se une al epítomo 4D5 de HER2 (por ejemplo, cualquiera de uno o más residuos en la región de alrededor del residuo 529 a alrededor del residuo 625, inclusive, véase la FIGURA 1 de la publicación de patente estadounidense n.º 2006/0018899).

«Se une específicamente», «unión específica» o «unión selectiva» significan que la unión es selectiva respecto al antígeno y se puede discriminar de interacciones no deseadas o no específicas. Es posible medir la capacidad de una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 para unirse a un determinante antigénico específico ya sea a través de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmones superficiales (SPR) (analizada en un instrumento BIAcore) (Liljeblad et ál, *Glyco J* 17, 323-329 (2000)), y ensayos de unión tradicionales (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)). En una modalidad, el alcance de la unión de un resto de unión al antígeno con una proteína no relacionada es menor que alrededor de 10 % de la unión de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 según se mide, por ejemplo, mediante SPR. En determinadas modalidades, una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 que se une al antígeno, o una molécula de unión al antígeno que comprende dicho resto de unión al antígeno, tiene una constante de disociación (K_D) de $< 1 \mu\text{M}$, $< 100 \text{ nM}$, $< 10 \text{ nM}$, $< 1 \text{ nM}$, $< 0.1 \text{ nM}$, $< 0.01 \text{ nM}$ o $< 0.001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menor, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

«Heregulina» (HRG), cuando se usa en la presente, hace referencia a un polipéptido codificado por el producto génico de la heregulina, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5,641,869 o Marchionni et ál., *Nature*, 362:312-318 (1993). Los ejemplos de heregulinas incluyen heregulina- α , heregulina- β 1, heregulina- β 2 y heregulina- β 3 (Holmes et ál., *Science*, 256:1205-1210 (1992); y la patente estadounidense n.º 5,641,869); factor de diferenciación neu (NDF) (Peles et ál. *Cell* 69: 205-216 (1992)); actividad de inducción del receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls et ál. *Cell* 72:801-815 (1993)); factores de crecimiento glial (GGF) (Marchionni et ál., *Nature*, 362:312-318 (1993)); factor derivado de neuronas motoras y sensoriales (SMDF) (Ho et

ál. J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995)); γ -heregulina (Schaefer et ál. Oncogene 15:1385-1394 (1997)). El término incluye variantes de secuencia de aminoácidos y/o fragmentos biológicamente activos de un polipéptido HRG de secuencia natural, tal como un fragmento de dominio similar a EGF de este (por ejemplo, HRG β 1177-244).

- 5 «Activación de HER» o «activación de HER2» hace referencia a la activación o fosforilación de cualquiera de uno o más receptores HER o receptores HER2. Generalmente, la activación de HER provoca la transducción de señales (por ejemplo, que es provocada por un dominio de cinasa intracelular de un receptor HER que fosforila los residuos de tirosina en el receptor HER o un polipéptido de sustrato). La activación de HER puede estar mediada por la unión del ligando
- 10 HER a un dímero HER que comprenda el receptor HER de interés. La unión del ligando HER a un dímero HER puede activar un dominio de cinasa de uno o más de los receptores HER en el dímero y provocar de ese modo la fosforilación de residuos de tirosina en uno o más de los receptores HER y/o la fosforilación de residuos de tirosina en uno o más polipéptidos de sustrato adicionales, tales como cinasas intracelulares MAPK o Akt.
- 15 Las formas «humanizadas» de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En la mayoría de los casos, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo
- 20 donante), tal como de ratón, rata, conejo o primate no humano con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar
- 25 adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una
- 30 secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et ál., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et ál., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

35

Fc de construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2.

En algunas modalidades, las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 descritas en la presente comprenden un Fc, por ejemplo, un Fc dimérico.

Las expresiones «dominio Fc» o «región Fc» se usan en la presente para definir una región del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia natural y variaciones de regiones Fc. A menos que se indique de otro modo en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de EU, también denominado índice de EU, tal como se describe en Kabat et ál., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Un «polipéptido de Fc» de un Fc dimérico, tal como se usa en la presente, hace referencia a uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, capaz de generar una autoasociación estable. Por ejemplo, un polipéptido de Fc de un Fc de IgG dimérico comprende una secuencia de dominio constante CH2 de IgG y CH3 de IgG.

Un dominio Fc comprende un dominio CH3 o un CH3 y un dominio CH2. El dominio CH3 comprende dos secuencias de CH3, una de cada uno de los dos polipéptidos de Fc del Fc dimérico. El dominio CH2 comprende dos secuencias de CH2, una de cada uno de los dos polipéptidos de Fc del Fc dimérico.

En algunos aspectos, el Fc comprende al menos una o dos secuencias de CH3. En algunos aspectos, el Fc se acopla con o sin uno o más enlazadores a una primera construcción polipeptídica de unión al antígeno y/o una segunda construcción polipeptídica de unión al antígeno. En algunos aspectos, el Fc es un Fc humano. En algunos aspectos, el Fc es un Fc de IgG o IgG1 humana. En algunos aspectos, el Fc es un Fc heterodimérico. En algunos aspectos, el Fc comprende al menos una o dos secuencias de CH2.

En algunos aspectos, el Fc comprende una o más modificaciones en al menos una de las secuencias de CH3. En algunos aspectos, el Fc comprende una o más modificaciones en al menos una de las secuencias de CH2. En algunos aspectos, un Fc es un solo polipéptido. En algunos aspectos, un Fc son múltiples péptidos, por ejemplo, dos polipéptidos.

En algunos aspectos, un Fc es un Fc descrito en las solicitudes de patente PCT/CA2011/001238, presentada el 4 de noviembre de 2011, o PCT/CA2012/050780, presentada el 2 de noviembre de 2012, cuyas descripciones se incorporan a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos.

Dominios CH3 modificados

En algunos aspectos, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 descrita en la presente comprende un Fc heterodimérico que comprende un dominio CH3 modificado que se modificó de forma asimétrica. El Fc heterodimérico puede comprender dos polipéptidos de dominio constante de cadena pesada: un primer polipéptido de Fc y un segundo polipéptido de

Fc, que pueden usarse de manera intercambiable siempre y cuando el Fc comprenda un primer polipéptido de Fc y un segundo polipéptido de Fc. Generalmente, el primer polipéptido de Fc comprende una primera secuencia de CH3 y el segundo polipéptido de Fc comprende una segunda secuencia de CH3.

- 5 Dos secuencias de CH3 que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos introducidas de forma asimétrica, generalmente, dan como resultado un Fc heterodimérico, en vez de un homodímero, cuando se dimerizan las dos secuencias de CH3. Tal como se usa en la presente, «modificaciones de aminoácidos asimétricas» hace referencia a cualquier modificación donde un aminoácido en una posición específica en una primera secuencia de CH3 es diferente al aminoácido en una segunda secuencia de CH3 en la misma posición, y la primera y la segunda secuencia de CH3, preferentemente, se emparejan para formar un heterodímero, en vez de un homodímero. Esta heterodimerización puede ser un resultado de la modificación de solo uno de los dos aminoácidos en la misma posición de aminoácidos respectiva en cada secuencia; o la modificación de ambos aminoácidos en cada secuencia en la misma posición respectiva en cada una de la primera y la segunda secuencia de CH3. La primera y la segunda secuencia de CH3 de un Fc heterodimérico pueden comprender una o más de una modificación de aminoácidos asimétrica.

La Tabla 2 proporciona la secuencia de aminoácidos de la secuencia de Fc de IgG1 humana, correspondiente a los aminoácidos 231 a 447 de la cadena pesada de IgG1 humana de longitud completa. La secuencia de CH3 comprende los aminoácidos 341-447 de la cadena pesada de IgG1 humana de longitud completa.

Típicamente un Fc puede incluir dos secuencias de cadena pesada contiguas (A y B) que son capaces de dimerizarse. En algunos aspectos, una o ambas secuencias de un Fc incluyen una o más mutaciones o modificaciones en las siguientes ubicaciones: L351, F405, Y407, T366, K392, T394, T350, S400 y/o N390, de acuerdo con la numeración de EU. En algunos aspectos, un Fc incluye una secuencia variante que se muestra en la Tabla 2. En algunos aspectos, un Fc incluye las mutaciones de la Variante 1 A-B. En algunos aspectos, un Fc incluye las mutaciones de la Variante 2 A-B. En algunos aspectos, un Fc incluye las mutaciones de la Variante 3 A-B. En algunos aspectos, un Fc incluye las mutaciones de la Variante 4 A-B. En algunos aspectos, un Fc incluye las mutaciones de la Variante 5 A-B.

Tabla 2: Secuencias de Fc de IgG1

35	Secuencia de Fc de IgG1 humana 231-447 (numeración de EU)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH
----	---	--

	EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:2)	
	Secuencia de Fc de IgG1 variante (231-447)	Cadena Mutaciones
5	1	A L351Y_F405A_Y407V
	1	B T366L_K392M_T394W
	2	A L351Y_F405A_Y407V
	2	B T366L_K392L_T394W
10	3	A T350V_L351Y_F405A_Y407V
	3	B T350V_T366L_K392L_T394W
	4	A T350V_L351Y_F405A_Y407V
	4	B T350V_T366L_K392M_T394W
	5	A T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V
15	5	B T350V_T366L_N390R_K392M_T394W

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

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

comprende, además, una modificación de aminoácidos T350V.

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

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

En una modalidad, un Fc heterodimérico comprende un dominio CH3 modificado que comprende las siguientes modificaciones de aminoácidos, donde «A» representa las modificaciones de aminoácidos en la primera secuencia de CH3, y «B» representa las modificaciones de aminoácidos en la segunda secuencia de CH3:

A:L351Y_F405A_Y407V, **B:**T366L_K392M_T394W, **A:**L351Y_F405A_Y407V,
B:T366L_K392L_T394W, **A:**T350V_L351Y_F405A_Y407V,
B:T350V_T366L_K392L_T394W, **A:**T350V_L351Y_F405A_Y407V,
B:T350V_T366L_K392M_T394W, **A:**T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V, y/o
B:T350V_T366L_N390R_K392M_T394W.

Una o más de las modificaciones de aminoácidos asimétricas pueden promover la formación de un Fc heterodimérico en el que el dominio CH3 heterodimérico tiene una estabilidad que es comparable con un dominio CH3 homodimérico de tipo salvaje. En una modalidad, la una o más modificaciones de aminoácidos asimétricas promueven la formación de un dominio Fc heterodimérico en el que el dominio Fc heterodimérico tiene una estabilidad que es comparable con un dominio Fc homodimérico de tipo salvaje. En una modalidad, una o más de las modificaciones de aminoácidos asimétricas promueven la formación de un dominio Fc heterodimérico en el que el dominio Fc heterodimérico tiene una estabilidad observada a través de la temperatura de fusión (T_m) en un estudio de calorimetría diferencial de barrido, y donde la

temperatura de fusión se encuentra dentro de los 4 °C de la observada para el dominio Fc homodimérico de tipo salvaje simétrico correspondiente. En algunos aspectos, el Fc comprende una o más modificaciones en al menos una de las secuencias de CH3 que promueven la formación de un Fc heterodimérico con estabilidad comparable a la del Fc homodimérico de tipo salvaje.

Ejemplos de construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2

En determinadas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es uno de los anticuerpos biparatómicos descritos en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2016/0289335 o la publicación de patente internacional n.º WO2015/077891.

En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es uno de v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 o v6717 (véanse las Tablas 3, 4, 5, y las Tablas de secuencias). En algunas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una secuencia de VH y una secuencia de VL del grupo de unión a ECD2 de uno de v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 o v6717. En algunas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una secuencia de VH y una secuencia de VL del grupo de unión a ECD2 de uno de v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 o v6717, y la otra construcción polipeptídica de unión al antígeno comprende una secuencia de VH y una secuencia de VL del grupo de unión a ECD4 de uno de v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 o v6717.

En algunas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende las secuencias de CDR del grupo de unión a ECD2 de uno de v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 o v6717. En algunas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende las secuencias de CDR del grupo de unión a ECD2 de uno de v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 o v6717, y la otra construcción polipeptídica de unión al antígeno comprende las secuencias de CDR del grupo de unión a ECD4 de uno de v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 o v6717.

Un experto en la técnica apreciará que puede introducirse una cantidad limitada de sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR o en las secuencias de VH o VL de anticuerpos conocidos sin que el anticuerpo pierda su capacidad para unirse a su diana. Las sustituciones de aminoácidos candidatas pueden identificarse mediante modelos informáticos o mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como el barrido con alanina, y las variantes resultantes se analizan para determinar la actividad de unión mediante técnicas estándar. Por consiguiente, en determinadas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende un conjunto de CDR (es

decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera) que tiene 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, o 100 % de identidad de secuencia con un conjunto de CDR del grupo de unión a ECD2 de uno de v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 o v6717, en donde la construcción polipeptídica de unión al antígeno conserva la capacidad de unirse a ECD2. En determinadas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una variante de estas secuencias de CDR que comprenden entre 1 y 10 sustituciones de aminoácidos a través de las seis CDR (es decir, las CDR pueden modificarse al incluir hasta 10 sustituciones de aminoácidos con cualquier combinación de las CDR a modificar), por ejemplo, entre 1 y 7 sustituciones de aminoácidos, entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos, entre 1 y 4 sustituciones de aminoácidos, entre 1 y 3 sustituciones de aminoácidos, entre 1 y 2 sustituciones de aminoácidos, o 1 sustitución de aminoácidos, a través de las CDR, en donde la variante conserva la capacidad de unirse a ECD2. Típicamente, dichas sustituciones de aminoácidos serán sustituciones conservadoras de aminoácidos. En determinadas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende un conjunto de CDR (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera) que tiene 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, o 100 % de identidad de secuencia con un conjunto de CDR del grupo de unión a ECD2 de v10000, en donde la construcción polipeptídica de unión al antígeno conserva la capacidad de unirse a ECD2.

En determinadas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una secuencia de VH que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH del grupo de unión a ECD2 de uno de v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 o v6717, en donde la construcción polipeptídica de unión al antígeno conserva la capacidad de unirse a ECD2. En algunas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una secuencia de VL que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL del grupo de unión a ECD2 de uno de v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 o v6717, en donde la construcción polipeptídica de unión al antígeno conserva la capacidad de unirse a ECD2.

En algunas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una secuencia de VH que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos

93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH del grupo de unión a ECD2 de v10000, en donde la construcción polipeptídica de unión al antígeno conserva la capacidad de unirse a ECD2. En algunas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una secuencia de VL que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL del grupo de unión a ECD2 de v10000, en donde la construcción polipeptídica de unión al antígeno conserva la capacidad de unirse a ECD2.

En determinadas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende un conjunto de CDR (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera) que tiene 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, o 100 % de identidad de secuencia con un conjunto de CDR del grupo de unión a ECD4 de uno de v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 o v6717, en donde la construcción polipeptídica de unión al antígeno conserva la capacidad de unirse a ECD4. En determinadas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una variante de estas secuencias de CDR que comprenden entre 1 y 10 sustituciones de aminoácidos a través de las seis CDR (es decir, las CDR pueden modificarse al incluir hasta 10 sustituciones de aminoácidos con cualquier combinación de las CDR a modificar), por ejemplo, entre 1 y 7 sustituciones de aminoácidos, entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos, entre 1 y 4 sustituciones de aminoácidos, entre 1 y 3 sustituciones de aminoácidos, entre 1 y 2 sustituciones de aminoácidos, o 1 sustitución de aminoácidos, a través de las CDR, en donde la variante conserva la capacidad de unirse a ECD4. Típicamente, dichas sustituciones de aminoácidos serán sustituciones conservadoras de aminoácidos. En determinadas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende un conjunto de CDR (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera) que tiene 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, o 100 % de identidad de secuencia con un conjunto de CDR del grupo de unión a ECD4 de v10000, en donde la construcción polipeptídica de unión al antígeno conserva la capacidad de unirse a ECD4.

En determinadas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una secuencia de VH que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH del grupo de unión a ECD4 de uno de v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 o v6717, en donde la construcción polipeptídica de unión al

antígeno conserva la capacidad de unirse a ECD4. En algunas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una secuencia de VL que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL del grupo de unión a ECD4 de uno de v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 o v6717, en donde la construcción polipeptídica de unión al antígeno conserva la capacidad de unirse a ECD4.

En algunas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una secuencia de VH que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH del grupo de unión a ECD4 de v10000, en donde la construcción polipeptídica de unión al antígeno conserva la capacidad de unirse a ECD4. En

algunas modalidades, una de las construcciones polipeptídicas de unión al antígeno de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una secuencia de VL que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL del grupo de unión a ECD4 de v10000, en donde la construcción polipeptídica de unión al antígeno conserva la capacidad de unirse a ECD4.

Tabla 3: Ejemplos de construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2

Variant e		Cadena A	Cadena B
5019	Dominio que contiene el epítipo diana	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	scFv
	Nombre del anticuerpo	Pertuzumab	Trastuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3 ^s	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T366I_N390R_K392M_T394W
5020	Dominio que contiene el epítipo diana	ECD4	ECD2
	Formato	scFv	Fab

Variant e		Cadena A	Cadena B
5	Nombre del anticuerpo	Trastuzumab	Pertuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
10 15	7091 Dominio que contiene el epítipo diana	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	scFv
	Nombre del anticuerpo	Pertuzumab	Trastuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
20 25 30	10000 Dominio que contiene el epítipo diana	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	scFv
	Nombre del anticuerpo	Pertuzumab	Trastuzumab
	Sustituciones de secuencia de Fab*	HC: T30A_A49G_L69F LC: Y96A	
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
35	6902 Dominio que contiene el epítipo diana	ECD4	ECD2
	Formato	Fab	Fab
	Nombre del anticuerpo	Trastuzumab	Pertuzumab
	Sustituciones de secuencia	HC: L143E_K145T LC: Q124R	HC: D146G_Q179K LC: Q124E_Q160E_T180E

Variant e		Cadena A	Cadena B
5	de Fab		
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
10	6903		
	Dominio que contiene el epítipo diana	ECD4	ECD2
	Formato	Fab	Fab
	Sustituciones de secuencia de Fab	HC: L143E_K145T LC: Q124R_Q1160K_T178R	HC: D146G_Q179K LC: Q124E_Q160E_T180E
	Nombre del anticuerpo	Trastuzumab	Pertuzumab
15	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
20	6717		
	Dominio que contiene el epítipo diana	ECD2	ECD4
	Formato	scFv	scFv
	Nombre del anticuerpo	Pertuzumab	Trastuzumab
25	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T366I_N390R_K392M_T394W

* Numeración de Fab o el dominio variable de acuerdo con Kabat (Kabat et ál., *Sequences of proteins of immunological interest*, 5.^a Edición, US Department of Health and Human Services, publicación de NIH n.º 91-3242, p.647, 1991)

§ Numeración de CH3 de acuerdo con el índice de EU como en Kabat (Edelman et ál., 1969, PNAS USA, 63:78-85)

Tabla 4: Secuencias de CDR del grupo de unión a ECD2 de las variantes v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 y v6717

Variante	CDR de HC	SEQ ID NO	CDR de LC	SEQ ID NO
5019, 5020, 7091, 6902, 6903 y 6717	H1: GFTFTDYT	6	L1: QDVSIG	12
	H2: VNPNSGGS	8	L2: SAS	14
	H3: ARNLGPSFYFDY	7	L3: QQYYIYPYT	13
10000	H1: GFTFADYT	39	L1: QDVSIG	27
	H2: VNPNSGGS	41	L2: SAS	29
	H3: ARNLGPSFYFDY	40	L3: QQYYIYPAT	28

Tabla 5: Secuencias de CDR del grupo de unión a ECD4 de las variantes v5019, v5020, v7091, v10000, v6902, v6903 y v6717

CDR de HC	SEQ ID NO	CDR de LC	SEQ ID NO
H1: GFNIKDTY	33	L1: QDVNTA	67
H2: IYPTNGYT	35	L2: SAS	68
H3: SRWGGDGFYAMDY	34	L3: QQHYTTPPT	69

Preparación de construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2

Las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 que se describen en la presente pueden producirse mediante el uso de composiciones y métodos recombinantes, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4,816,567 o la publicación de patente internacional n.º WO2015/077891.

En una modalidad, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 descrita en la presente. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 (por ejemplo, cadenas ligeras y/o pesadas de la construcción de unión al antígeno). En una modalidad adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. Tal como se conoce en la técnica, debido a que muchos aminoácidos son codificados por más de un codón, múltiples ácidos nucleicos pueden codificar una única secuencia de polipéptidos. En la presente se proporciona un ejemplo de ácido nucleico para cada polipéptido de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2; sin embargo, se entiende que pueden usarse otros ácidos nucleicos para preparar la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 descrita en la presente.

En una modalidad, el ácido nucleico se proporciona en un vector multicistrónico. En una modalidad adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En dicha modalidad, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia

de aminoácidos que comprende la VL de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH de la construcción polipeptídica de unión al antígeno, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL de la construcción polipeptídica de unión al antígeno y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH de la construcción polipeptídica de unión al antígeno. En una modalidad, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula embrionaria de riñón humano (HEK) o una célula linfóide (por ejemplo, una célula YO, NS0, Sp20). En una modalidad, se proporciona un método para elaborar una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2, en donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2, tal como se describió anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 y, opcionalmente, recuperar la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 de la célula hospedadora (o medio de cultivo de células hospedadoras).

Para la producción recombinante de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2, se aísla un ácido nucleico que codifica una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2, por ejemplo, tal como se describió anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para la clonación y/o expresión adicional en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante el uso de procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligera y pesada de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2).

La expresión «sustancialmente purificada» hace referencia a una construcción descrita en la presente, o una variante de esta, que puede carecer sustancialmente o esencialmente de los componentes que normalmente acompañan o interactúan con la proteína tal como se encuentra en su entorno natural, es decir, una célula natural, o una célula hospedadora en el caso de una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 producida de forma recombinante que, en determinadas modalidades, carece sustancialmente de material celular, incluidas las preparaciones de proteína con menos de alrededor de 30 %, menos de alrededor de 25 %, menos de alrededor de 20 %, menos de alrededor de 15 %, menos de alrededor de 10 %, menos de alrededor de 5 %, menos de alrededor de 4 %, menos de alrededor de 3 %, menos de alrededor de 2 %, o menos de alrededor de 1 % (en peso seco) de proteína contaminante.

Cuando la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es producida de forma recombinante por las células hospedadoras, en determinadas modalidades, la proteína está presente en alrededor de 30 %, alrededor de 25 %, alrededor de 20 %, alrededor de 15 %, alrededor de 10 %, alrededor de 5 %, alrededor de 4 %, alrededor de 3 %, alrededor de 2 %, o

alrededor de 1 % o menos del peso seco de las células. Cuando la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es producida de forma recombinante por las células hospedadoras, en determinadas modalidades, la proteína está presente en el medio de cultivo en alrededor de 5 g/L, alrededor de 4 g/L, alrededor de 3 g/L, alrededor de 2 g/L, alrededor de 1 g/L, alrededor de 750 mg/L, alrededor de 500 mg/L, alrededor de 250 mg/L, alrededor de 100 mg/L, alrededor de 50 mg/L, alrededor de 10 mg/L, o alrededor de 1 mg/L o menos del peso seco de las células. En determinadas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 «sustancialmente purificada» producida por los métodos descritos en la presente, tiene un nivel de pureza de al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 35 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 45 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 55 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 65 %, al menos alrededor de 70 %, específicamente, un nivel de pureza de al menos alrededor de 75 %, 80 %, 85 %, y más específicamente, un nivel de pureza de al menos alrededor de 90 %, un nivel de pureza de al menos alrededor de 95 %, un nivel de pureza de al menos alrededor de 99 % o más según se determina mediante métodos adecuados tales como análisis SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC y electroforesis capilar.

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 incluyen células eucariotas y procariotas descritas en la presente.

Una «célula hospedadora recombinante» o «célula hospedadora» hace referencia a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, independientemente del método utilizado para la inserción, por ejemplo, absorción directa, transducción, acoplamiento f u otros métodos conocidos en la técnica para crear células hospedadoras recombinantes. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o de manera alternativa, puede estar integrado en el genoma hospedador.

Tal como se usa en la presente, el término «eucariota» hace referencia a organismos que pertenecen al dominio filogenético Eucarya tales como animales (que incluyen, de modo no taxativo, mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.) ciliados, plantas (que incluyen, de modo no taxativo, monocotiledóneas, dicotiledóneas, algas, etc.) hongos, levaduras, flagelados, microsporidios, protistas, etc.

Tal como se usa en la presente, el término «procariota» hace referencia a organismos procariotas. Por ejemplo, un organismo no eucariota puede pertenecer al dominio filogenético de Eubacteria (que incluye, de modo no taxativo, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, etc.) o al dominio filogenético de Archaea (que incluye, de modo no taxativo, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium* tal como *Haloferax volcanii* y especie *Halobacterium* NRC-1, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus*

furiosus, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuryopyrum pemix*, etc.).

Por ejemplo, se puede producir una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 en bacterias, en particular, cuando no son necesarias la glicosilación y la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5,648,237, 5,789,199 y 5,840,523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), págs. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*.) Después de la expresión, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 puede aislarse de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o la levadura son hospedadores de clonación o de expresión adecuados para los vectores que codifican la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2, que incluyen cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glicosilación se han «humanizado», lo que genera la producción de una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 con un patrón de glicosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li et ál., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 glicosiladas también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado diversas cepas de baculovirus que se pueden utilizar junto con células de insectos, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales también se pueden utilizar como hospedadores. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 y 6,417,429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir construcciones de unión al antígeno en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados también se pueden utilizar como hospedadores. Por ejemplo, pueden ser útiles las líneas celulares de mamíferos que se adaptan para el crecimiento en suspensión.

Otros ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles son las líneas de células CV1 de riñón de mono transformadas por SV40 (COS-7), líneas embrionarias humanas de riñón (293 o células 293 como se describe, por ejemplo, en Graham et ál. *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251, (1980)); células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA), células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata y búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather et ál. *Annals N.Y.*

Acad. Sci. 383:44-68 (1982), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas de células hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), las que incluyen células CHO DHFR⁻ (Urlaub et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Se encuentra una reseña de determinadas líneas celulares

5 hospedadoras de mamíferos adecuadas para la producción de una construcción de unión al antígeno, por ejemplo, en Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, tomo 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), págs. 255-268 (2003).

En una modalidad, las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 que se describen en la presente se producen en células de mamífero estables, mediante un método que

10 comprende: transfectar al menos una célula de mamífero estable con: un ácido nucleico que codifica la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 en una relación predeterminada; y expresar el ácido nucleico en al menos una célula de mamífero. En algunas modalidades, la relación predeterminada de ácido nucleico se determina en experimentos de transfección transitoria para determinar la relación relativa de ácidos nucleicos de entrada que

15 tienen como resultado el porcentaje más alto de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 en el producto expresado.

En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 se produce en células de mamífero inestables, en donde el producto de expresión de la al menos una célula de mamífero estable comprende un porcentaje mayor de la construcción biespecífica de unión al

20 antígeno anti-HER2 glicosilada deseada en comparación con los polipéptidos monoméricos de cadena pesada o ligera u otros anticuerpos. En algunas modalidades, la identificación de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 glicosilada se realiza mediante una o ambas de cromatografía líquida y espectrometría de masas.

Si es necesario, es posible purificar o aislar las construcciones biespecíficas de unión al antígeno

25 anti-HER2 después de la expresión. Las proteínas pueden aislarse o purificarse de muchas maneras que los expertos en la técnica conocen. Los métodos de purificación estándares incluyen técnicas de cromatografía que incluyen intercambio iónico, interacción hidrofóbica, afinidad, calibrado o filtración en gel, y la fase inversa, llevada a cabo a presión atmosférica o

30 alta presión mediante sistemas tales como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación incluyen también las técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, la diálisis y el cromatoenfoque. También son útiles las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, junto con la concentración de proteínas. Tal como se conoce en la técnica, una variedad de proteínas naturales se une a Fc y a anticuerpos, y estas proteínas pueden ser útiles para la purificación de

35 construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 descritas en la presente. Por ejemplo, las proteínas bacterianas A y G se unen a la región Fc. Asimismo, la proteína bacteriana L se une a la región Fab de algunos anticuerpos. La purificación puede activarse a menudo mediante un compañero de fusión particular. Por ejemplo, los anticuerpos pueden purificarse

mediante el uso de resina de glutatión si se emplea una fusión GST, cromatografía de afinidad de Ni^{+2} si se emplea una etiqueta His o un anticuerpo anti-flag inmovilizado si se usa una etiqueta flag. Para una guía general de las técnicas de purificación adecuadas, véase, por ejemplo, que se incorpora en su totalidad mediante referencia, Protein Purification: Principles and Practice, 3.^a Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994, que se incorpora en su totalidad mediante referencia. El grado de purificación necesario variará dependiendo del uso de las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2. En algunos casos, no es necesaria ninguna purificación.

En determinadas modalidades, se purifican las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 mediante el uso de cromatografía de intercambio aniónico que incluye, de modo no taxativo, cromatografía en columnas de Sefarosa Q, Sefarosa DEAE, poros HQ, poros DEAF, Toyopearl Q, Toyopearl QAE, Toyopearl DEAE, Recurso/fuente Q y DEAE, Fractogel Q y DEAE. En modalidades específicas, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 descrita en la presente se purifica mediante el uso de cromatografía de intercambio catiónico que incluye, de modo no taxativo, las columnas de Sefarosa SP, Sefarosa CM, Poros HS, Poros CM, Toyopearl SP, Toyopearl CM, Recurso/Fuente S y CM, Fractogel S y CM y sus columnas equivalentes y comparables.

Además, las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 descritas en la presente pueden sintetizarse químicamente mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, véase Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N.Y y Hunkapiller et ál., Nature, 310:105-111 (1984)). Por ejemplo, puede sintetizarse un polipéptido correspondiente a un fragmento de un polipéptido mediante el uso de un sintetizador de péptidos. Asimismo, si se desea, es posible introducir aminoácidos no clásicos o análogos de aminoácidos químicos como sustitución o adición a la secuencia de polipéptidos. Los aminoácidos no clásicos incluyen, de modo no taxativo, D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido 2,4diaminobutírico, ácido alfa-amino isobutírico, ácido 4aminobutírico, Abu, ácido 2-amino butírico, γ -Abu, ϵ -Ahx, ácido 6amino hexanoico, Aib, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos diseñados tales como β -metilaminoácidos, α -metilaminoácidos, N α -metilaminoácidos y análogos de aminoácidos en general. Asimismo, el aminoácido puede ser D (dextrógiro) o L (levógiro).

Modificaciones postraduccionales:

En determinadas modalidades, las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 descritas en la presente se modifican en forma diferencial durante o después de la traducción. El término «modificado», tal como se usa en la presente, hace referencia a cualquier cambio

realizado a un polipéptido dado, tal como los cambios en la longitud del polipéptido, la secuencia de aminoácidos, la estructura química, la modificación cotraduccional o la modificación postraduccional de un polipéptido. La forma «(modificado)» del término significa que los polipéptidos que se tratan se modifican opcionalmente, es decir, los polipéptidos de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 pueden modificarse o no modificarse. La expresión «modificado de forma postraduccional» hace referencia a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que le ocurre a dicho aminoácido luego de que ha sido incorporado a una cadena de polipéptidos. El término abarca, a modo de ejemplo solamente, las modificaciones cotraduccionales *in vivo*, las modificaciones cotraduccionales *in vitro* (tales como en un sistema de traducción sin células), las modificaciones postraduccionales *in vivo* y las modificaciones postraduccionales *in vitro*.

En algunas modalidades, la modificación es al menos una de: glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica y enlace a una molécula de anticuerpo o construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 u otro ligando celular. En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 se modifica químicamente mediante técnicas conocidas que incluyen, de modo no taxativo, escisión química específica mediante bromuro cianógeno, tripsina, quimiotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH_4 , acetilación, formilación, oxidación, reducción y síntesis metabólica en presencia de tunicamicina.

Las modificaciones postraduccionales adicionales de las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 incluyen, por ejemplo, cadenas de carbohidratos unidas a N o unidas a O, procesamiento de extremos N o C), unión de restos químicos a la estructura principal de aminoácidos, modificaciones químicas de cadenas de carbohidratos unidas a N o unidas a O, y la adición o eliminación de un residuo de metionina del extremo N como resultado de la expresión de la célula hospedadora procariota. las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 descritas en la presente se modifican con una etiqueta detectable, tal como una etiqueta enzimática, fluorescente, isotópica o de afinidad para permitir la detección y el aislamiento de la proteína. En determinadas modalidades, los ejemplos de etiquetas enzimáticas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa, los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina-biotina y avidina/biotina, los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina, un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol, los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen yodo, carbono, azufre, tritio, indio, tecnecio, talio, galio, paladio, molibdeno, xenón, flúor.

En modalidades específicas, las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2

descritas en la presente se unen a quelantes macrocíclicos que se asocian a iones radiometálicos.

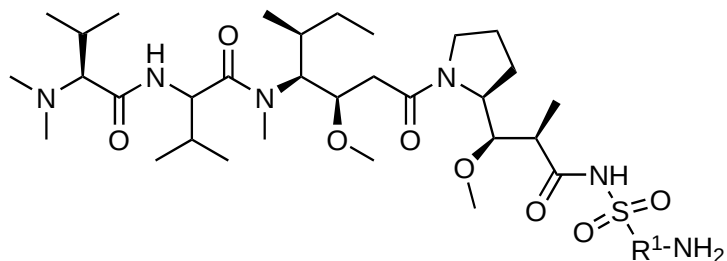
En algunas modalidades, las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 descritas en la presente se modifican mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraducciona, o mediante técnicas de modificación química que se conocen en la técnica. En determinadas modalidades, el mismo tipo de modificación puede encontrarse presente en el mismo grado o en grados diferentes en diversos sitios en un polipéptido dado. En determinadas modalidades, los polipéptidos de construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 descritos en la presente son ramificados, por ejemplo, como resultado de la ubiquitinación, y en algunas modalidades, son cíclicos con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados resultan de procesos naturales postraduccionales o son producidos mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulación covalente, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, PROTEINS--STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2.^a ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman y Company, Nueva York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter et ál., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990); Rattan et ál., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)).

Conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC)

Determinadas modalidades se refieren a un método para tratar el BTC mediante el uso de un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 conjugada con un análogo de auristatina en una relación de anticuerpo respecto a fármaco (DAR) promedio baja. Tal como se usa en la presente, «DAR promedio baja» hace referencia a una DAR promedio < 3.9. En los métodos descritos, son particularmente útiles los ADC que comprenden una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 conjugada con un análogo de la auristatina con una DAR promedio de alrededor de 2.5 o menos, tal como entre alrededor de 1.8 y 2.5. En determinadas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 incluida en los ADC es v10000.

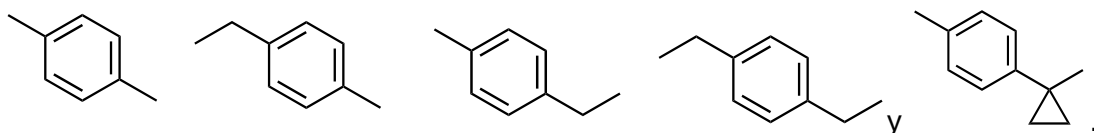
En determinadas modalidades, el análogo de auristatina comprendido por los ADC para su uso

en los métodos descritos en la presente puede ser un análogo de auristatina tal como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2016/041082. En determinadas modalidades, el análogo de auristatina comprendido por los ADC para su uso en los métodos descritos en la presente es un compuesto con la Fórmula general (I):

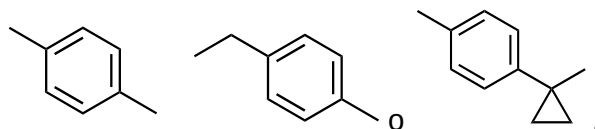


(I)

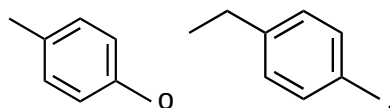
en donde R¹ se selecciona de:



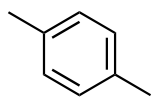
En determinadas modalidades, en los compuestos con la Fórmula (I), R¹ es:



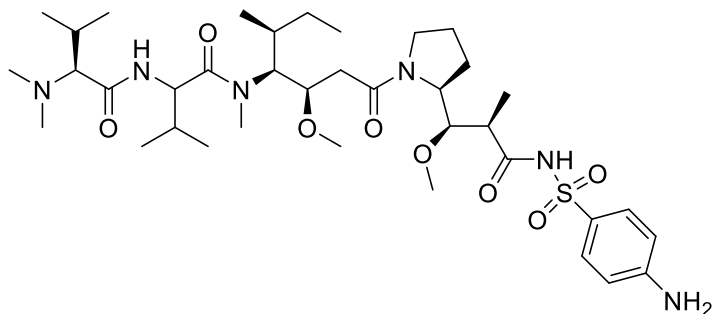
En determinadas modalidades, en los compuestos con la Fórmula (I), R¹ es:



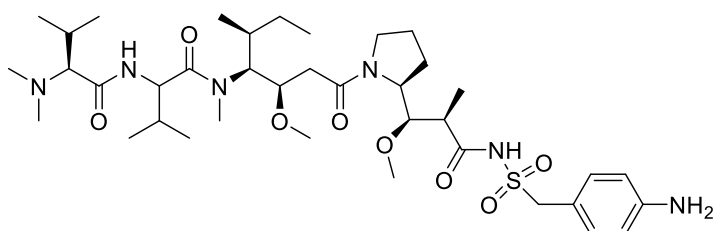
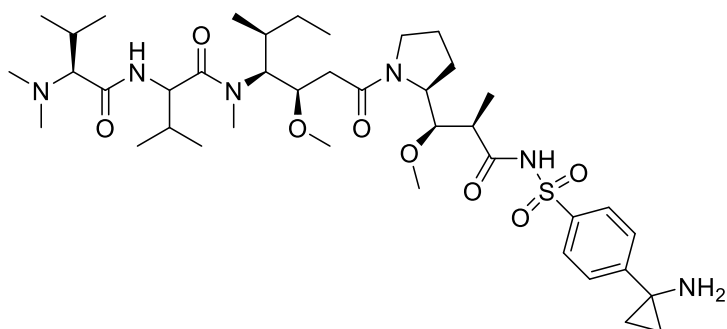
En determinadas modalidades, en los compuestos con la Fórmula (I), R¹ es:



En determinadas modalidades, el compuesto con la Fórmula (I) se selecciona de:

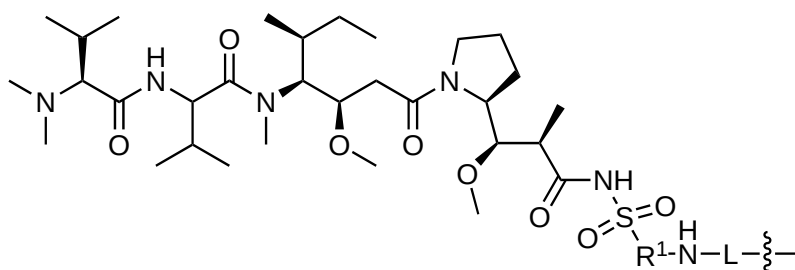


Compuesto 16

Compuesto **17**Compuesto **18**

Los compuestos con la Fórmula general (I) pueden prepararse mediante protocolos estándar de química orgánica sintética a partir de materiales de partida comercialmente disponibles. En la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2016/041082 se proporcionan métodos de síntesis ilustrativos.

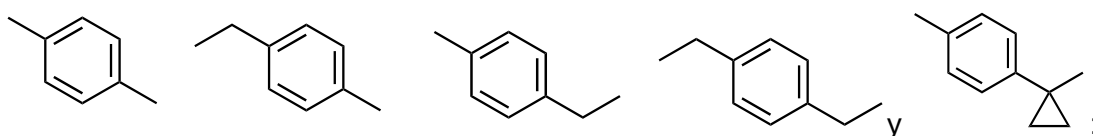
En determinadas modalidades, el ADC para su uso en los métodos descritos en la presente comprende una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 conjugada con un análogo de auristatina (toxina) a través de un enlazador (L), en donde la toxina enlazadora tiene la Fórmula general (II):



(II)

en donde:

R¹ se selecciona de:

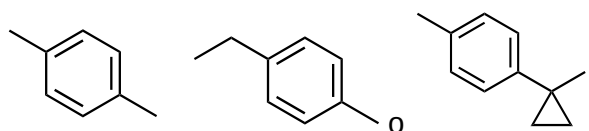


L es un enlazador no escindible; y

representa el punto de unión de la toxina enlazadora a la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2.

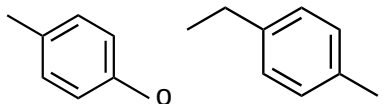
En algunas modalidades, en la toxina enlazadora con la Fórmula general (II), R¹ es:

34

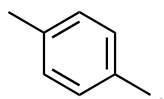


En algunas modalidades, en la toxina enlazadora con la Fórmula general (II), R^1 es:

5



En algunas modalidades, en la toxina enlazadora con la Fórmula (II), R^1 es:



10

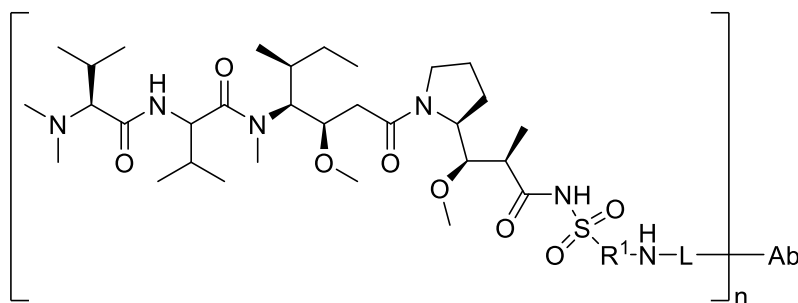
En algunas modalidades, en la toxina enlazadora con la Fórmula general (II), L es un enlazador que contiene péptido.

En algunas modalidades, en la toxina enlazadora con la Fórmula general (II), L es un enlazador de escisión de proteasa.

15

En determinadas modalidades, el ADC para su uso en los métodos descritos en la presente comprende una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 conjugada con un análogo de auristatina (toxina) a través de un enlazador (L), y tiene la Fórmula general (III):

20



(III)

25

en donde:

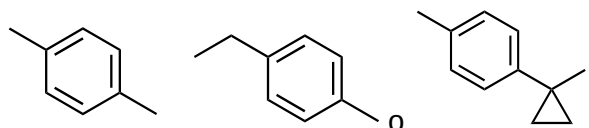
R^1 y L son tal como se definen para la Fórmula general (II);

n es la relación de fármaco respecto a anticuerpo (DAR) promedio y es menor que 3.9, y

Ab es la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2.

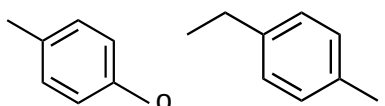
30

En algunas modalidades, en el ADC con la Fórmula general (III), R^1 es:

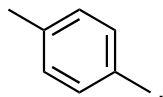


En algunas modalidades, en el ADC con la Fórmula general (III), R^1 es:

35



En algunas modalidades, en el ADC con la Fórmula general (III), R^1 es:



En algunas modalidades, en el ADC con la Fórmula general (III), L es un enlazador que contiene péptido.

En algunas modalidades, en el ADC con la Fórmula general (III), L es un enlazador de escisión de proteasa.

En algunas modalidades, en el ADC con la Fórmula general (III), n se encuentra entre 0.5 y 3.8.

En algunas modalidades, en el ADC con Fórmula general (III), n se encuentra entre alrededor de 1.0 y 3.8, entre alrededor de 1.0 y 3.5, entre alrededor de 1.0 y 3.0, o entre alrededor de 1.0 y 2.5.

En algunas modalidades, en el ADC con Fórmula general (III), n se encuentra entre alrededor de 1.5 y 3.8, entre alrededor de 1.5 y 3.5, entre alrededor de 1.5 y 3.0, o entre alrededor de 1.5 y 2.5.

En algunas modalidades, en el ADC de la Fórmula general (III), n se encuentra entre alrededor de 1.8 y 2.8, o entre alrededor de 1.8 y 2.5.

En algunas modalidades, en el ADC con la Fórmula general (III), Ab es ≤ 10000 .

También se contemplan las combinaciones de cualquiera de las modalidades anteriores para los ADC con la Fórmula general (III) y cada combinación forma una modalidad independiente a los efectos de la presente descripción.

En los ADC descritos en la presente, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 se enlaza al análogo de auristatina (toxina) mediante un enlazador. Los enlazadores son restos bifuncionales o multifuncionales capaces de enlazar una o más moléculas de toxina a un anticuerpo. Un enlazador bifuncional (o monovalente) enlaza un solo fármaco con un solo sitio en el anticuerpo, mientras que un enlazador multifuncional (o polivalente) enlaza más de una molécula de toxina con un solo sitio en el anticuerpo. Los enlazadores capaces de enlazar una molécula de toxina a más de un sitio en el anticuerpo también pueden considerarse multifuncionales.

La unión de un enlazador a un anticuerpo puede lograrse de varias maneras, tales como a través de lisinas superficiales en el anticuerpo, acoplamiento reductor a carbohidratos oxidados en el anticuerpo y a través de residuos de cisteína en el anticuerpo liberados mediante la reducción de los enlaces disulfuro entre cadenas. De manera alternativa, la unión de un enlazador a un anticuerpo puede lograrse mediante la modificación del anticuerpo para incluir residuos de cisteína adicionales (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 7,521,541; 8,455,622 y 9,000,130) o aminoácidos no naturales que proporcionan manejo de reactivos, tales como selenometionina, p-acetilfenilalanina, formilglicina o p-azidometil-L-fenilalanina (véase, por ejemplo: Hofer et ál., *Biochemistry*, 48:12047-12057 (2009); Axup et ál., *PNAS*, 109:16101-16106 (2012); Wu et ál., *PNAS*, 106:3000-3005 (2009); Zimmerman et ál., *Bioconj. Chem.*,

25:351-361 (2014)), para permitir la conjugación específica del sitio.

Los enlazadores incluyen un grupo funcional capaz de reaccionar con el grupo o los grupos diana en el anticuerpo, y uno o más grupos funcionales capaces de reaccionar con un grupo diana en la toxina. Los grupos funcionales adecuados son conocidos en la técnica e incluyen los descritos, por ejemplo, en *Bioconjugate Techniques* (G.T. Hermanson, 2013, Academic Press).

Los ejemplos no taxativos de grupos funcionales que reaccionan con cisteínas o tioles libres incluyen maleimida, haloacetamida, haloacetilo, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros ácidos, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. También son útiles en este contexto las maleimidias «autoestabilizantes», tal como se describe en Lyon et ál., *Nat. Biotechnol.*, 32:1059-1062 (2014).

Los ejemplos no taxativos de grupos funcionales para reaccionar con lisinas de la superficie en un anticuerpo o aminas libres en una toxina incluyen ésteres activados tales como ésteres de N-hidroxisuccinamida (NHS), ésteres de sulfo-NHS, ésteres de imido tales como reactivo de Traut, isotiocianatos, aldehídos anhídridos y ácidos tales como anhídrido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Otros ejemplos incluyen tetrafluoroborato de succinimido-1,1,3,3-tetra-metiluronio (TSTU) y hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP).

Los ejemplos no taxativos de grupos funcionales capaces de reaccionar con un grupo electrofílico en el anticuerpo o la toxina (tal como un grupo carbonilo de la cetona o aldehído) incluyen hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida.

Otros enlazadores incluyen aquellos que tienen un grupo funcional que permite puentear dos cisteínas entre cadenas en el anticuerpo, tales como un enlazador ThioBridge™ (Badescu et ál., *Bioconjug. Chem.*, 25:1124–1136 (2014)), un enlazador de ditiomaleimida (DTM) (Behrens et ál., *Mol. Pharm.*, 12:3986–3998 (2015)), un enlazador a base de ditioaril(TCEP)piridazinadiona (Lee et ál., *Chem. Sci.*, 7:799-802 (2016)), un enlazador a base de dibromopiridazinadiona (Maruani et ál., *Nat. Commun.*, 6:6645 (2015)) y otros conocidos en la técnica.

Un enlazador puede comprender varios componentes enlazadores. Típicamente, un enlazador comprenderá dos o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores ilustrativos incluyen grupos funcionales para la reacción con el anticuerpo, grupos funcionales para la reacción con la toxina, tensores, componentes peptídicos, grupos autoinmolantes, grupos de autoeliminación, restos hidrofílicos, y similares. Se conocen varios componentes enlazadores en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación.

Es posible obtener determinados componentes útiles de varias fuentes comerciales, tales como Pierce Biotechnology, Inc. (actualmente Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y Molecular Biosciences Inc. (Boulder, Colo.), o pueden sintetizarse de acuerdo con los procedimientos descritos en la técnica (véase, por ejemplo, Toki et ál., *J. Org. Chem.*, 67:1866-1872 (2002); Dubowchik, et ál., *Tetrahedron Letters*, 38:5257-60 (1997); Walker, M. A., *J. Org. Chem.*,

60:5352-5355 (1995); Frisch, et ál., *Bioconjugate Chem.*, 7:180-186 (1996); las patentes estadounidenses n.º 6,214,345 y 7,553,816, y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 02/088172).

El enlazador empleado en los ADC descritos en la presente es un enlazador escindible. Un enlazador escindible es típicamente susceptible a la escisión en condiciones intracelulares, por ejemplo, a través de procesos lisosómicos. Los ejemplos incluyen enlazadores que son sensibles a la proteasa, sensibles al ácido, sensibles a la reducción o fotolábiles.

Los enlazadores escindibles adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores que comprenden un componente peptídico que incluye dos o más aminoácidos y es escindible mediante una proteasa intracelular, tal como una proteasa lisosómica o una proteasa endosómica. Un componente peptídico puede comprender residuos de aminoácidos de origen natural y/o aminoácidos menores y/o análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como la citrulina. Los componentes peptídicos pueden diseñarse y optimizarse para la escisión enzimática mediante una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, catepsina B, C o D, o una proteasa plasmina.

En determinadas modalidades, el enlazador incluido en los ADC puede ser un enlazador que contiene dipéptido, tal como un enlazador que contiene valina-citrulina (Val-Cit) o fenilalanina-lisina (Phe-Lys). Otros ejemplos de dipéptidos adecuados para inclusión en enlazadores incluyen Val-Lys, Ala-Lys, Me-Val-Cit, Phe-homoLys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Arg, Ala-Phe, Val-Ala, Met-Lys, Asn-Lys, Ile-Pro, Ile-Val, Asp-Val, His-Val, Met-(D)Lys, Asn-(D)Lys, Val-(D)Asp, NorVal-(D)Asp, Ala-(D)Asp, Me₃Lys-Pro, FenilGly-(D)Lys, Met-(D)Lys, Asn-(D)Lys, Pro-(D)Lys y Met-(D)Lys. Los enlazadores escindibles también pueden incluir componentes peptídicos más largos tales como tripéptidos, tetrapéptidos o pentapéptidos. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, los tripéptidos Met-Cit-Val, Gly-Cit-Val, (D)Phe-Phe-Lys y (D)Ala-Phe-Lys, y los tetrapéptidos Gly-Phe-Leu-Gly y Ala-Leu-Ala-Leu.

Los ejemplos adicionales de enlazadores escindibles incluyen enlazadores que contienen disulfuro, tales como, por ejemplo, N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butanoato (SPBD) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo butanoato (sulfo-SPBD). Los enlazadores que contienen disulfuro pueden incluir opcionalmente grupos adicionales para proporcionar un impedimento estérico adyacente al enlace disulfuro para mejorar la estabilidad extracelular del enlazador, por ejemplo, la inclusión de un grupo dimetilo germinal. Otros enlazadores adecuados incluyen enlazadores hidrolizables dentro de un intervalo de pH o a un pH específico, tal como enlazadores de hidrazona. Los enlazadores que comprenden combinaciones de estas funcionalidades también pueden ser útiles, por ejemplo, en la técnica se conocen los enlazadores que comprenden tanto una hidrazona como un disulfuro.

Un ejemplo adicional de un enlazador escindible es un enlazador que comprende un β -glucurónido, que es escindible mediante la β -glucuronidasa, una enzima presente en los

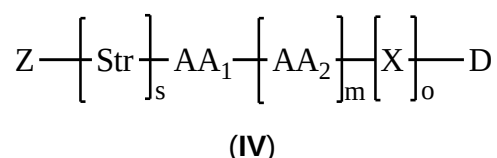
lisosomas y el intersticio del tumor (véase, por ejemplo, De Graaf et ál. Curr. Pharm. Des., 8:1391–1403 (2002)).

Opcionalmente, los enlazadores escindibles pueden comprender, además, uno o más componentes adicionales tales como grupos autoinmolantes y de autoeliminación, tensores o restos hidrofílicos.

Los grupos autoinmolantes y de autoeliminación que son útiles en los enlazadores incluyen, por ejemplo, grupos p-aminobenciloxicarbonilo (PABC) y éter p-aminobencilo (PABE) y etilendiamina metilada (MED). Otros ejemplos de grupos autoinmolantes incluyen, de modo no taxativo, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PABC o PABE, tales como derivados heterocíclicos, por ejemplo, derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 7,375,078. Otros ejemplos incluyen grupos que experimentan ciclación tras la hidrólisis del enlace de amida, tal como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues et ál., Chemistry Biology, 2:223-227 (1995)) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, et ál., J. Org. Chem., 55:5867-5877 (1990)).

Los tensores útiles para los enlazadores para ADC incluyen, por ejemplo, grupos alquileo y tensores a base de ácidos alifáticos, diácidos, aminas o diaminas, tales como diglicolato, malonato, caproato y caproamida. Otros tensores incluyen, por ejemplo, tensores a base de glicina, tensores de polietilenglicol (PEG) y tensores de monometoxi polietilenglicol (mPEG). Los tensores PEG y mPEG también funcionan como restos hidrofílicos.

En determinadas modalidades, el enlazador comprendido por los ADC para su uso en los métodos descritos en la presente son enlazadores a base de péptidos que tienen la Fórmula general (IV):



en donde:

Z es un grupo funcional capaz de reaccionar con el grupo de direccionamiento en la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2;

Str es un tensor;

AA₁ y AA₂ son cada uno, independientemente, un aminoácido, en donde AA₁-[AA₂]_m forma un sitio de escisión de proteasa;

X es un grupo autoinmolante;

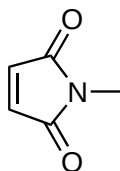
D es el punto de unión al análogo de auristatina;

s es 0 o 1;

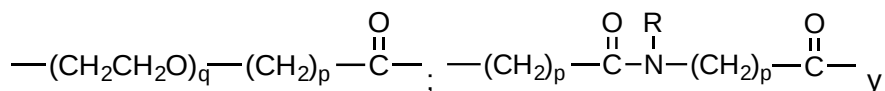
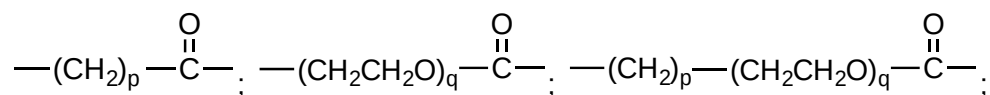
m es un número entero entre 1 y 4, y

o es 0, 1 o 2.

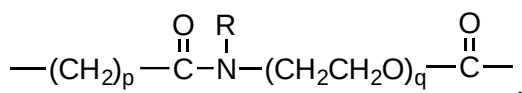
En algunas modalidades, en la Fórmula general (IV), Z es:



5 En algunas modalidades, en la Fórmula general (IV), Str se selecciona de:



10



en donde:

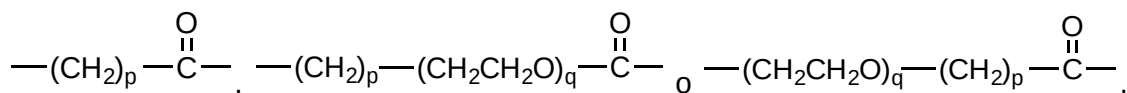
R es H o alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$;

p es un número entero entre 2 y 10, y

15

q es un número entero entre 1 y 10.

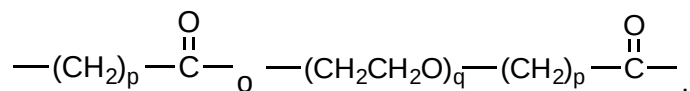
En algunas modalidades, en la Fórmula general (IV), Str es:



20

en donde p y q son tal como se definieron anteriormente.

En algunas modalidades, en la Fórmula general (IV), Str es:



en donde p es un número entero entre 2 y 6, y

25

q es un número entero entre 2 y 8.

En algunas modalidades, en la Fórmula general (IV), $\text{AA}_1\text{--}[\text{AA}_2]_m$ se selecciona de Val-Lys, Ala-Lys, Phe-Lys, Val-Cit, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Arg, Ala-Phe, Val-Ala, Met-Lys, Asn-Lys, Ile-Pro, Ile-Val, Asp-Val, His-Val, Met-(D)Lys, Asn-(D)Lys, Val-(D)Asp, NorVal-(D)Asp, Ala-(D)Asp, Me₃Lys-Pro, PhenylGly-(D)Lys, Met-(D)Lys, Asn-(D)Lys, Pro-(D)Lys, Met-(D)Lys, Met-Cit-Val, Gly-Cit-Val, (D)Phe-Phe-Lys, (D)Ala-Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly y Ala-Leu-Ala-Leu.

30

En algunas modalidades, en la Fórmula general (IV), m es 1 (es decir, $\text{AA}_1\text{--}[\text{AA}_2]_m$ es un dipéptido).

En algunas modalidades, en la Fórmula general (IV), $\text{AA}_1\text{--}[\text{AA}_2]_m$ es un dipéptido seleccionado de Val-Lys, Ala-Lys, Phe-Lys, Val-Cit, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit y Trp-Cit.

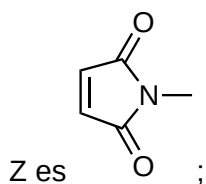
35

En algunas modalidades, en la Fórmula general (IV), m es 1, 2 o 3.

En algunas modalidades, en la Fórmula general (IV), s es 1.

En algunas modalidades, en la Fórmula general (IV), o es 0.

En algunas modalidades, en la Fórmula general (IV):



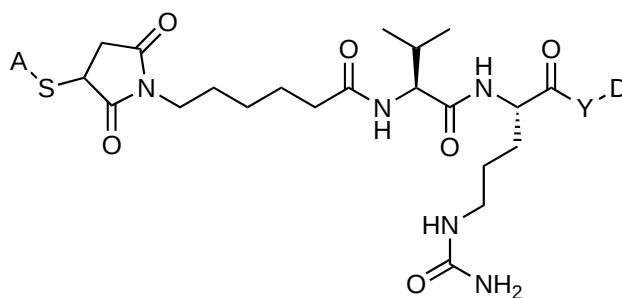
Str es $\text{---}(\text{CH}_2)_p\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C---}_\text{O}\text{---}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{---}(\text{CH}_2)_p\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C---}$, en donde p es un número entero entre 2 y 6, y q es un número entero entre 2 y 8;

m es 1 y AA₁-[AA₂]_m es un dipéptido seleccionado de Val-Lys, Ala-Lys, Phe-Lys, Val-Cit, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit y Trp-Cit.

s es 1, y

o es 0.

En determinadas modalidades, el enlazador incluido en los ADC para su uso en los métodos descritos en la presente tiene la Fórmula general (V):



(V)

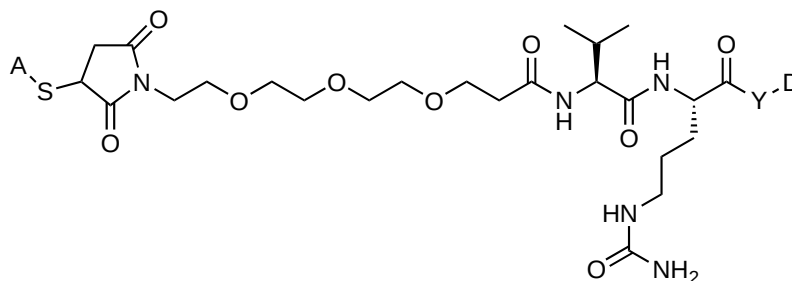
en donde:

A-S- es el punto de unión a la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2;

Y es uno o más componentes enlazadores adicionales, o se encuentra ausente, y

D es el punto de unión al análogo de auristatina.

En determinadas modalidades, el enlazador incluido en los ADC para su uso en los métodos descritos en la presente tiene la Fórmula general (VI):



(VI)

en donde:

A-S- es el punto de unión a la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2;

Y es uno o más componentes enlazadores adicionales, o se encuentra ausente, y

D es el punto de unión al análogo de auristatina.

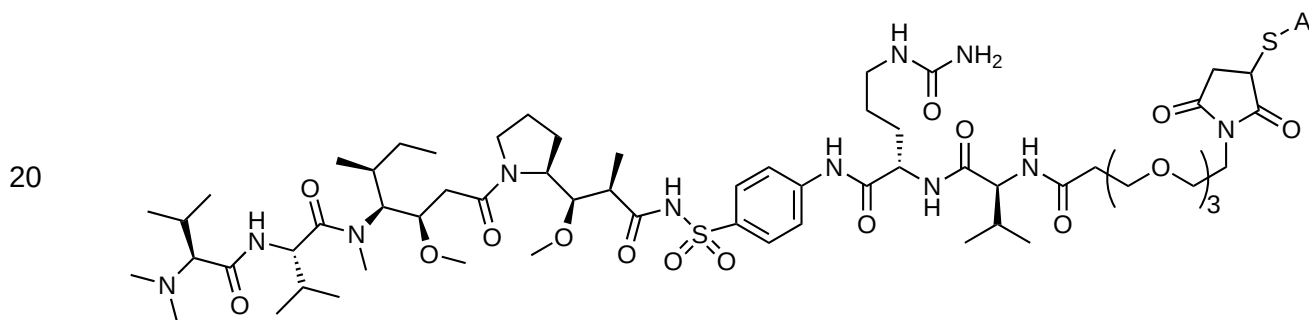
En determinadas modalidades, los ADC para su uso en los métodos descritos en la presente comprende un análogo de auristatina con la Fórmula general (I) conjugado con v10000 en una DAR promedio baja a través de un enlazador con la Fórmula general (IV), (V) o (VI).

5 En determinadas modalidades, el ADC para su uso en los métodos descritos en la presente comprende v10000 conjugado en una DAR promedio baja a través de una toxina enlazadora con la Fórmula general (II) en la que el enlazador (L) tiene la Fórmula general (IV), (V) o (VI).

En determinadas modalidades, el ADC para su uso en los métodos descritos en la presente comprende v10000 y tiene la Fórmula general (III) que se mostró anteriormente, en la que el enlazador (L) tiene la Fórmula general (IV), (V) o (VI).

En determinadas modalidades, los ADC para su uso en los métodos descritos en la presente comprende un análogo de auristatina conjugado con v10000 en una DAR promedio baja a través de un enlazador con la Fórmula general (IV), (V) o (VI), en la que el análogo de auristatina es el Compuesto 16, Compuesto 17 o Compuesto 18.

15 En determinadas modalidades, el ADC para su uso en los métodos descritos en la presente comprende una toxina enlazadora que tiene la estructura:



en donde A-S- es el punto de unión a la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2.

Preparación de conjugados de fármaco y anticuerpo

Los ADC para su uso en los métodos descritos en la presente pueden prepararse mediante una de varias vías conocidas en la técnica, mediante el uso de reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, *Bioconjugate Techniques* (G.T. Hermanson, 2013, Academic Press, y los Ejemplos que se proporcionan en la presente). Por ejemplo, la conjugación puede lograrse mediante (1) reacción de un grupo nucleofílico o un grupo electrofílico de un anticuerpo con un enlazador bifuncional para formar un intermedio de anticuerpo-enlazador Ab-L, a través de enlace covalente, seguido por la reacción con un análogo de auristatina activado (D), o (2) reacción de un grupo nucleofílico o un grupo electrofílico de un análogo de auristatina con un enlazador para formar la toxina enlazadora D-L, a través de enlace covalente, seguido por la reacción con un grupo nucleofílico

o un grupo electrofílico de un anticuerpo.

Tal como se describió anteriormente, el análogo de auristatina puede conjugarse a través un enlazador adecuado con varios grupos en el anticuerpo para proporcionar el ADC. Por ejemplo, la conjugación puede ser a través de lisinas superficiales, a través de carbohidratos oxidados o a través de residuos de cisteína que se han liberado mediante la reducción de uno o más enlaces disulfuro entre cadenas. De manera alternativa, el anticuerpo puede modificarse para incluir residuos de cisteína adicionales o aminoácidos no naturales que proporcionan manejo de reactivos, tales como selenometionina, p-acetilfenilalanina, formilglicina o p-azidometil-L-fenilalanina. Dichas modificaciones se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 7,521,541; 8,455,622 y 9,000,130; Hofer et ál., *Biochemistry*, 48:12047-12057 (2009); Axup et ál., *PNAS*, 109:16101-16106 (2012); Wu et ál., *PNAS*, 106:3000-3005 (2009); Zimmerman et ál., *Bioconj. Chem.*, 25:351-361 (2014)).

En determinadas modalidades, los ADC para su uso en los métodos descritos en la presente comprenden un análogo de auristatina conjugado a través de un enlazador adecuado con residuos de cisteína en la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 que se han liberado mediante la reducción de uno o más enlaces disulfuro entre cadenas.

En los ADC descritos en la presente, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 se conjuga con la toxina a través de un enlazador en una relación promedio de fármaco con respecto a anticuerpo (DAR) baja, específicamente, una DAR promedio menor que 3.9 pero mayor que 0.5, por ejemplo, entre alrededor de 1.5 y alrededor de 2.5 en determinadas modalidades.

En la técnica se conocen diversos métodos para preparar ADC con una DAR promedio baja (véase, por ejemplo, la revisión de McCombs y Owen, *The AAPS Journal*, 17(2):339-351 (2015) y las referencias mencionadas allí; Boutureira & Bernardes, *Chem. Rev.*, 115:2174-2195 (2015)).

Por ejemplo, para la conjugación con residuos de cisteína, se puede llevar a cabo una reducción parcial de los enlaces disulfuro entre cadenas de anticuerpos, seguida por la conjugación con la toxina enlazadora. Se puede lograr una reducción parcial al limitar la cantidad de agente reductor usado en la reacción de reducción (véase, por ejemplo, Lyon et ál., *Methods in Enzymology*, 502:123-138 (2012), y los ejemplos mencionados allí, y los Ejemplos proporcionados en la presente). Los agentes reductores adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ditioneitol (DTT), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 2-mercaptoetanol, cisteamina y varias fosfinas solubles en agua. De manera alternativa o adicional, se pueden emplear menos equivalentes de toxina enlazadora para obtener una DAR promedio baja.

De manera alternativa, se puede emplear un anticuerpo modificado genéticamente en el que uno o más de los residuos de cisteína que forman los enlaces disulfuro entre cadenas se reemplazan con un residuo de serina, lo que da como resultado menos residuos de cisteína disponibles para la conjugación (véase, McDonagh et ál. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS*, 19(7):299-307). El

anticuerpo modificado genéticamente puede tratarse luego con un agente reductor y conjugarse con la toxina enlazadora.

Otro enfoque es emplear un enlazador de bis-tiol que une dos cisteínas que normalmente forman un enlace disulfuro entre cadenas. El uso de un enlazador bis-tiol que porta solo una molécula de toxina produciría un ADC con una DAR4 máxima para un anticuerpo de tamaño completo, si los cuatro enlaces disulfuro entre cadenas se reducen y se reemplazan con el enlazador bis-tiol. Se puede usar una reducción parcial de los enlaces disulfuro entre cadenas y/o menos equivalentes de enlazador junto con un enlazador bis-tiol para reducir aún más la DAR. En la técnica se conocen varios enlazadores bis-tiol (véase, por ejemplo, Badescu et ál., *Bioconjug Chem.*, 25(6):1124-1136 (2014); Behrens et ál., *Mol. Pharm.*, 12:3986–3998 (2015); Lee et ál., *Chem. Sci.*, 7:799-802 (2016); Maruani et ál., *Nat. Commun.*, 6:6645 (2015)).

Los enfoques modificación genética de cisteína también pueden emplearse para generar ADC con una DAR promedio baja. Dichos enfoques implican modificar genéticamente cisteínas accesibles al solvente en el anticuerpo para proporcionar un manejo específico del sitio para la conjugación. Se han identificado diversos sitios adecuados para la introducción de un residuo de cisteína con la estructura de IgG, e incluyen los que se describen en Junutula, et ál., *J. Immunol Methods*, 332(1-2):41-52 (2008); Junutula, et ál., *Nat. Biotechnol.*, 26(8), 925-932 (2008), y las patentes estadounidenses n.º 9,315,581; 9,000,130; 8,455,622; 8,507,654 y 7,521,541.

Los ADC con DAR promedio baja también se pueden preparar mediante conjugación con lisina empleando cantidades limitantes de toxina enlazadora activada. También puede emplearse una reacción selectiva en los aminoácidos del extremo N del anticuerpo. Por ejemplo, la serina del extremo N se puede oxidar hasta obtener un aldehído con peryodato, luego, reaccionar con toxina enlazadora (véase, por ejemplo, Thompson, et ál., *Bioconjug Chem.*, 26(10):2085-2096 (2015)). De manera similar, los residuos de cisteína del extremo N se pueden hacer reaccionar selectivamente con aldehídos para proporcionar tiazolidinonas (véase, por ejemplo, Bernardes, et ál., *Nature Protocols*, 8:2079-2089).

Los enfoques adicionales incluyen la modificación genética del anticuerpo para incluir uno o más aminoácidos no naturales, tales como p-acetilfenilalanina (pAcPhe) o selenocisteína (Sec). El grupo ceto en pAcPhe se puede hacer reaccionar con una toxina enlazadora que comprende una alcóxiamina o hidrazida de extremo para formar un enlace de oxima o hidrazona (véase, por ejemplo, Axup, et ál., *PNAS USA*, 109:16101-16106 (2012)). Los anticuerpos que contienen sec pueden reaccionar con toxinas enlazadoras que contienen maleimida o yodoacetamida para formar un conjugado de selenoéter (véase, por ejemplo, Hofer, et ál., *Biochemistry*, 48:12047-12057 (2009)).

Los anticuerpos también pueden modificarse genéticamente para que incluyan etiquetas peptídicas reconocidas por ciertas enzimas para permitir la conjugación catalizada mediante enzimas. Por ejemplo, la Sortasa-A (SortA) reconoce la secuencia LPXTG. Este pentapéptido

puede diseñarse en el extremo N o C del anticuerpo para permitir la conjugación mediada por SortA (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2016/0136298; Kornberger y Skerra, *mAbs*, 6(2):354-366 (2014)). Las transglutaminasas también se han empleado para generar ADC de DAR2 mediante el uso de anticuerpos que se han desglicosilado en la posición N297 (que expone Q295 para la conjugación enzimática) o mediante anticuerpos modificados genéticamente para que incluyan una «etiqueta de glutamina» (LLQG) (Jeger, et ál., *Angew. Chem.*, 49:9995-9997 (2010); Strop, et ál., *Chem. Biol.*, 20(2):161-167 (2013)). En otro enfoque, es posible introducir un residuo de formilglicina en un anticuerpo mediante la modificación genética de una secuencia de consenso apropiada en el anticuerpo y la expresión conjunta del anticuerpo modificado genéticamente con la enzima generadora de formilglicina (FGE). La funcionalidad de aldehído de la formilglicina introducida puede usarse luego como un manejo para la conjugación de toxina (véase, por ejemplo, Drake, et ál., *Bioconjug Chem.*, 25(7):1331-1341 (2014)).

Otro enfoque utilizado para generar ADC de DAR2 es mediante la conjugación de la toxina enlazadora con los azúcares nativos que se encuentran en los anticuerpos glicosilados. La conjugación con anticuerpos glicosilados se puede lograr, por ejemplo, mediante la oxidación con peryodato de residuos de azúcares de extremo para producir aldehídos, que luego pueden conjugarse con una toxina enlazadora apropiada, o mediante enfoques de glicoingeniería en los cuales los azúcares nativos se modifican con residuos de ácido siálico de extremo que luego pueden oxidarse para producir aldehídos para la conjugación de la toxina enlazadora (Zhou, et ál., *Bioconjug. Chem.*, 25(3):510-520 (2014)).

También se ha informado el uso de reticulación por UV para la conjugación de restos activos con anticuerpos. Este método utiliza el sitio de unión a nucleótidos (NBS) para la funcionalización covalente específica del sitio de anticuerpos con restos tiol reactivos. Se usó una versión de cisteína conjugada con ácido indol-3-butírico (IBA) para fotorreticular específicamente en el sitio un resto tiol reactivo con anticuerpos en el NBS. El resto tiol puede usarse luego para conjugar la toxina enlazadora que tiene un grupo reactivo tiol (Alves, et ál., *Bioconjug. Chem.*, 25(7):1198-1202 (2014)).

De manera alternativa, los ADC con una DAR promedio baja pueden aislarse de una preparación de ADC que contiene una mezcla de especies de DAR mediante el uso de técnicas de separación cromatográfica, tales como cromatografía de interacción hidrofóbica (véase, por ejemplo, Hamblett, et ál., *Clin. Cancer Res.*, 10:7063-7070 (2004); Sun, et ál., *Bioconj Chem.*, 28:1371-81 (2017); publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2014/0286968).

Los ADC con una DAR promedio baja también pueden generarse mediante la adición de un anticuerpo no conjugado (es decir, DAR0) a preparaciones de ADC que tienen una DAR promedio ≥ 3.9 . Tal como se conoce en la técnica, la mayoría de los métodos de conjugación producen una preparación de ADC que incluye varias especies de DAR, en donde la DAR

informada es el promedio de las especies de DAR individuales. En determinadas modalidades, los ADC que incluyen una proporción de especies de DAR0 pueden ser ventajosos. En algunas modalidades, el ADC para su uso en los métodos descritos en la presente que tiene una DAR promedio menor que 3.9 incluye al menos 5 % de especies de DAR0. En algunas modalidades, el ADC para su uso en los métodos descritos en la presente incluye al menos 10 % de especies de DAR0, por ejemplo, al menos 15 % de especies DAR0 o al menos 20 % de especies DAR0. En algunas modalidades, el ADC para su uso en los métodos descritos en la presente incluye entre alrededor de 5 % y alrededor de 50 % de especies de DAR0, por ejemplo, entre alrededor de 10 % y alrededor de 50 % de especies de DAR0, entre alrededor de 10 % y alrededor de 40 % o entre alrededor de 10 % y alrededor de 30 % de especies de DAR0.

La DAR promedio para los ADC puede determinarse mediante técnicas estándar tales como análisis espectroscópico UV/VIS, técnicas basadas en ELISA, técnicas de cromatografía tales como cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), espectrometría de masas (MS) UV-MALDI y MS MALDI-TOF. Además, también se puede analizar la distribución de formas ligadas a fármacos (por ejemplo, la fracción de las especies DAR0, DAR1, DAR2, etc.) mediante diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen MS (con o sin una etapa de separación cromatográfica adjunta), cromatografía de interacción hidrofóbica, HPLC de fase inversa o electroforesis en gel de enfoque isoelectrico (IEF) (véase, por ejemplo, Sun et ál., Bioconj Chem., 28:1371-81 (2017); Wakankar et ál., mAbs, 3:161-172 (2011)).

En determinadas modalidades, la DAR promedio de los ADC se determina mediante técnicas de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

Después de la conjugación, los ADC pueden purificarse y separarse de los reactivos no conjugados y/o cualquier agregado de conjugado mediante métodos de purificación conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, de modo no taxativo, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, ultrafiltración, ultrafiltración centrífuga y combinaciones de estos.

Composiciones farmacéuticas

En la presente también se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 descrita en la presente. Las composiciones farmacéuticas comprenden la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 y un portador farmacéuticamente aceptable.

La expresión «farmacéuticamente aceptable» significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o incluido en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida en general para el uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término «portador» hace referencia a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra el agente terapéutico. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o

sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. En algunos aspectos, el portador es un portador artificial que no se encuentra en la naturaleza. Puede usarse agua como portador cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones de glicerol y dextrosa acuosas como portadores líquidos, particularmente, para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada deshidratada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición también puede contener, si se desea, cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes o agentes de amortiguación de pH. Estas composiciones pueden tener forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales, tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándares tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. En «Remington's Pharmaceutical Sciences» de E. W. Martin se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2, preferentemente, en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para la administración adecuada al paciente. La formulación debería adaptarse al modo de administración.

En determinadas modalidades, la composición que comprende la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en amortiguador acuoso isotónico esterilizado. En los casos que sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de inyección. En líneas generales, los ingredientes se proporcionan ya sea separados o mezclados en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o saché que indica la cantidad de agente activo. En los casos en que la composición se deba administrar por infusión, se puede dosificar con un frasco de infusión que contenga agua de grado farmacéutico esterilizada o solución salina. Cuando la composición se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para la inyección o solución salina de forma tal que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

En determinadas modalidades, las composiciones descritas en la presente se formulan como formas neutras o sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con

aniones tales como las derivadas de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, isopropilamina de hidróxido férrico, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

5 **Métodos para tratar el cáncer de las vías biliares (BTC)**

En la presente se describen métodos para tratar el cáncer de las vías biliares (BTC), que comprenden administrar a un sujeto que tiene BTC una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC, tal como se describe en la presente, en una cantidad eficaz para tratar, prevenir o mejorar esta enfermedad o trastorno. En modalidades específicas de los métodos descritos en la presente, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es v10000. En otras modalidades específicas de los métodos descritos en la presente el ADC es v10000 enlazado a un análogo de auristatina.

«Trastorno» o «enfermedad» hace referencia a cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o método que se describe en la presente. Esto incluye trastornos y enfermedades crónicas y agudas, que incluyen las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. En las modalidades descritas en la presente, el trastorno o la enfermedad es cáncer de las vías biliares, que se describe con mayor detalle a continuación.

El término «sujeto» o «paciente» hace referencia a un animal, en algunas modalidades, un mamífero, que es el objeto de tratamiento, observación o experimento. Un animal puede ser un ser humano, un primate no humano, un animal de compañía (por ejemplo, perros, gatos y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) o animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayos y similares).

El término «mamífero», tal como se usa en la presente, incluye, de modo no taxativo, seres humanos, primates no humanos, caninos, felinos, murinos, bovinos, equinos y porcinos.

«Tratamiento» hace referencia a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o la célula que se está tratando, y puede realizarse durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseados del tratamiento incluyen, de modo no taxativo, prevenir la reaparición de una enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de evolución de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de la enfermedad y lograr la remisión o mejora del pronóstico. En algunas modalidades, pueden usarse las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 o ADC que se describen en la presente para retrasar el desarrollo de una enfermedad o enlentecer la evolución de una enfermedad. En algunas modalidades, pueden usarse las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 o ADC para retrasar el desarrollo de un BTC. En una modalidad, las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2, ADC y métodos que se describen en la presente pueden provocar la inhibición del

crecimiento tumoral/cáncer BTC. En otra modalidad, puede usarse la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC para enlentecer la evolución de un BTC.

La expresión «cantidad eficaz», tal como se usa en la presente, hace referencia a aquella cantidad de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 que se administra que
5 logrará el objetivo del método citado, por ejemplo, aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas de la enfermedad, afección o trastorno que en tratamiento. Es posible determinar la cantidad de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 que será eficaz en el tratamiento o la inhibición de la enfermedad o el trastorno mediante técnicas clínicas estándar.

Además, opcionalmente, es posible emplear ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos
10 de dosificación óptimos. La dosis exacta que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad del BTC, y se debería decidir de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelos animales. El término «terapia de primera línea», «tratamiento de primera línea» o «terapia primaria» es un
15 régimen de tratamiento que generalmente se acepta como el tratamiento inicial para un paciente, teniendo en cuenta el tipo y la etapa de un cáncer. El término «terapia de segunda línea» o «tratamiento de segunda línea» es un régimen de tratamiento que se administra típicamente si la terapia de primera línea no proporciona la eficacia deseada.

El término «terapia neoadyuvante» hace referencia a un tratamiento proporcionado como una
20 primera etapa para reducir el tamaño de un tumor antes de proporcionar el tratamiento principal, usualmente, cirugía. Los ejemplos de terapia neoadyuvante incluyen, de modo no taxativo, quimioterapia, radioterapia y terapia hormonal. La terapia neoadyuvante puede considerarse como una terapia de primera línea.

El término «terapia adyuvante» hace referencia a un tratamiento adicional contra el cáncer
25 proporcionado después del tratamiento de primera línea para reducir el riesgo de que el cáncer vuelva. La terapia adyuvante puede incluir, de modo no taxativo, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida (típicamente, fármacos de moléculas pequeñas o anticuerpos que se dirigen a tipos específicos de células cancerosas en lugar de células normales), o terapia
30 biológica (tales como vacunas, citocinas, anticuerpos o terapia génica, por ejemplo).

Un «cáncer avanzado» es un cáncer que se ha desarrollado hasta el punto en que no puede extirparse de forma segura o donde una cura o remisión a largo plazo es muy improbable. Los
35 cánceres se vuelven avanzados al crecer adyacentes a estructuras que impiden su extirpación o al diseminarse desde donde comenzaron, cruzando las líneas de tejido o hacia otras partes del cuerpo, tales como los ganglios linfáticos u otros órganos. Los cánceres avanzados pueden estar localmente avanzados, lo que significa que se han diseminado fuera del órgano del sitio primario, pero aún no se han diseminado hacia sitios distantes. Los cánceres avanzados también pueden ser metastásicos, lo que significa que las células cancerosas se han diseminado desde el sitio

donde comenzó el cáncer (el sitio primario) hacia otras partes más distantes del cuerpo (sitios secundarios).

Un cáncer «extirpable» es uno que puede tratarse mediante cirugía. Un cáncer «no extirpable» es uno que no puede tratarse mediante cirugía, típicamente, debido a que el cáncer se ha
5 diseminado hacia los tejidos que rodean el tumor principal. Determinados cánceres pueden ser evaluados por un médico como «parcialmente extirpables» en función del grado de diseminación hacia los tejidos circundantes.

La construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC puede administrarse al sujeto de acuerdo con métodos conocidos. Se conocen varios sistemas de administración y pueden
10 usarse para administrar una formulación de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 descrita en la presente, por ejemplo, la encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los
15 métodos de introducción incluyen, de modo no taxativo, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o el ADC pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través del revestimiento mucocutáneo o epitelial (por ejemplo, la mucosa oral, rectal e intestinal, etc.) y
20 pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, en determinadas modalidades, puede ser deseable introducir las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 descritas en la presente al sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada que incluye la inyección intraventricular e intratecal. Un catéter intraventricular puede facilitar la inyección intraventricular, por ejemplo, un
25 catéter unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. También es posible utilizar la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y la formulación con un agente de aerosolización. En modalidades específicas, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC puede administrarse por vía intravenosa (IV).
30 En una modalidad específica, puede ser deseable administrar las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 o ADC que se describen en la presente localmente en el área que requiere tratamiento. Eso puede lograrse, por ejemplo y de modo no taxativo, mediante infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con una venda para la herida luego de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o
35 mediante un implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluyen membranas, tales como membranas sialastic, o fibras. Preferentemente, cuando se administra una proteína, tal como una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2, se debe tener cuidado de usar materiales que no absorban la proteína.

En otra modalidad, es posible administrar las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 o ADC en una vesícula, en particular, un liposoma (véanse Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et ál., *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ib.*, págs. 317-327; en general, véase *ib.*).

En aun otra modalidad, las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 o ADC pueden administrarse en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, se puede usar una bomba (véase, Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et ál., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et ál., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otra modalidad, se pueden usar materiales poliméricos (véase, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); véase también Levy et ál., *Science* 228:190 (1985); During et ál., *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard et ál., *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)). En aun otra modalidad, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana terapéutica, que requiere, de ese modo, solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Aplicaciones of Controlled Release*, vol. 2, págs. 115-138 (1984)).

Las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 o ADC pueden administrarse solos o junto con otros tipos de tratamientos (por ejemplo, radioterapia, quimioterapia, tratamiento hormonal, inmunoterapia y agentes antitumorales). En general, se prefiere la administración de productos de un origen de especie o reactividad de especie (en el caso de anticuerpos) que es de la misma especie que la del paciente. Por lo tanto, en una modalidad, se administran construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 humanas o humanizadas, derivados de fragmentos, análogos o ácidos nucleicos a un paciente humano como terapia o profilaxis.

Los cánceres de las vías biliares (BTC, también denominados «cánceres biliares») incluyen cáncer de vesícula biliar, carcinoma ampular, colangiocarcinoma y adenocarcinoma del conducto cístico. El colangiocarcinoma (CCA) también puede clasificarse como CCA intrahepático o CCA extrahepático. En una modalidad, las construcciones biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC pueden usarse en un método para tratar el BTC. En una modalidad, las construcciones biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC que se describen en la presente pueden usarse en un método para tratar el BTC avanzado no extirpable. En una modalidad, las construcciones biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC que se describen en la presente pueden usarse en un método para tratar el cáncer de vesícula biliar, carcinoma ampular, colangiocarcinoma y adenocarcinoma del conducto cístico. En otras modalidades, las construcciones biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC que se describen en la

presente pueden usarse en un método para tratar el CCA intrahepático o CCA extrahepático.

En una modalidad, las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 o ADC pueden usarse para tratar a un sujeto que tiene un BTC que muestra expresión, amplificación o activación de HER2. Un BTC que «presenta expresión, amplificación o activación de HER2» es uno en el cual, en una prueba de diagnóstico, expresa (incluso sobreexpresa) un receptor de HER2, presenta amplificación del gen de HER2 y/o demuestra de otra manera la activación o fosforilación de un receptor de HER2.

Un BTC que «presenta activación de HER2» es uno en el cual, en una prueba de diagnóstico, demuestra activación o fosforilación de un receptor de HER2. Dicha activación puede determinarse directamente (por ejemplo, al medir la fosforilación de HER2 mediante ELISA) o indirectamente (por ejemplo, mediante perfil de la expresión génica). En una modalidad, las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 o ADC pueden usarse para tratar a un sujeto que tiene un BTC que muestra expresión de HER2.

Un BTC con «amplificación o sobreexpresión del receptor de HER2» es uno con niveles significativamente mayores de un gen o proteína de receptor de HER2 en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede ser provocada por la amplificación de genes o por transcripción o traducción aumentada. La sobreexpresión o amplificación del receptor de HER2 puede determinarse en un ensayo diagnóstico o pronóstico por medio de la evaluación de los niveles aumentados de la proteína HER2 presente en la superficie de una célula (por ejemplo, por medio de un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). En una modalidad, la sobreexpresión de HER2 puede analizarse mediante IHC, por ejemplo, mediante el uso de HERCEPTEST® (Dako). Las secciones de tejido incrustadas en parafina de una biopsia de tumor pueden someterse al ensayo IHC y asignárseles un criterio de intensidad de tinción de la proteína HER2 como se indica continuación:

Puntuación 0: no se observa tinción o se observa tinción de membrana en menos de 10 % de las células tumorales.

Puntuación 1+: se detecta una tinción de membrana leve/apenas perceptible en más de 10 % de las células tumorales. Las células tienen solo parte de su membrana teñida.

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

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

Aquellos tumores con puntaje de 0 o 1+ para la evaluación de la expresión de HER2 pueden caracterizarse como que no sobreexpresan HER2, mientras que aquellos tumores con puntajes de 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que sobreexpresan HER2. En una modalidad, las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 o ADC pueden usarse para tratar a un sujeto que tiene un BTC que muestra sobreexpresión y/o amplificación de HER2.

De manera alternativa o adicional, es posible medir los niveles de ácido nucleico que codifica HER2 en la célula, por ejemplo, mediante hibridación *in situ* (ISH), lo que incluye hibridación fluorescente *in situ* (FISH; véase WO98/45479 publicada en octubre de 1998) e hibridación cromogénica *in situ* (CISH; véase, por ejemplo, Tanner et ál., Am. J. Pathol. 157 (5): 1467-1472 (2000); Bella et ál., J. Clin. Oncol. 26: (may 20 supl; abstr 22147) (2008)), transferencia southern, técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) o secuencia de última generación (NGS). La evaluación de la amplificación génica de HER2 mediante el uso de estos métodos se informa típicamente como positiva (+) o negativa (-), por ejemplo, FISH+ para cánceres con amplificación génica de HER2 o FISH- para cánceres que no tienen amplificación génica de HER2. La evaluación de la amplificación génica de HER2 mediante NGS también puede informarse con respecto a la cantidad de copias del gen HER2. En células normales, hay dos copias del gen HER2. Por consiguiente, un cáncer puede considerarse como un cáncer con amplificación génica de HER2 si tiene más de dos copias del gen HER2.

En la presente se describen métodos para tratar a un sujeto que tiene un BTC que presenta expresión, amplificación o activación de HER2, que comprende proporcionar al sujeto una cantidad eficaz de una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC que se describe en la presente. En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC puede usarse en el tratamiento de un sujeto que tiene un BTC con amplificación génica de HER2 3+. En otras modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC puede usarse en el tratamiento de un BTC con amplificación génica de HER2 2+. En otras modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC puede usarse en el tratamiento de un BTC con amplificación génica de HER2 1+. En otras modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC puede usarse en el tratamiento de un BTC evaluado como HER2 3+, sin amplificación génica de HER2. En otras modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC puede usarse en el tratamiento de un BTC evaluado como HER2 2+, sin amplificación génica de HER2. En otras modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC puede usarse en el tratamiento de un BTC evaluado como HER2 1+, sin amplificación génica de HER2. En algunas modalidades, el sujeto a tratar puede no haber tenido tratamiento previo para el BTC y la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC se administra como tratamiento de primera línea. En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC puede usarse como terapia adyuvante o neoadyuvante para tratar a sujetos que tienen cáncer extirpable o parcialmente extirpable. En otras modalidades, el sujeto a tratar puede haber tenido uno o más tratamientos previos para el BTC y la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC se administra como tratamiento de segunda línea. Uno o más tratamientos previos para el BTC pueden incluir tratamientos seleccionados de

quimioterapia sistémica tal como gemcitabina sola o con un agente quimioterapéutico a base de platino, quimiorradiación a base de fluoropirimidina, radioterapia sin quimioterapia adicional, anticuerpos (que incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos de direccionamiento anti-HER2) y agentes en investigación (es decir, aquellos que actualmente se someten a ensayos clínicos, pero que aún no han sido aprobados por la FDA). Los agentes quimioterapéuticos a base de platino pueden incluir cisplatino u oxaliplatino. En una modalidad, la quimioterapia sistémica comprende gemcitabina con cisplatino o gemcitabina con oxaliplatino.

Los ejemplos de cantidades eficaces de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC que pueden administrarse a un sujeto con BTC pueden estar entre 0.1 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC se administra a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 mg/kg de peso corporal.

En algunas modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 se administra de forma semanal, bisemanal (Q2W), cada tres semanas (Q3W), o cada 4 semanas (Q4W). Los ejemplos de cantidades eficaces para dosificación semanal de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 varía entre alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 30 mg/kg. Los ejemplos de cantidades eficaces para dosificación bisemanal de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 varía entre alrededor de 10 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg. Los ejemplos de cantidades eficaces para dosificación de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 cada tres semanas varía entre alrededor de 15 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg. Los ejemplos de cantidades eficaces para dosificación de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 cada cuatro semanas varía entre alrededor de 40 mg/kg a alrededor de 70 mg/kg.

En algunas modalidades, la cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es de 5, 10 o 15 mg/kg semanalmente. En algunas modalidades, la cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es de 10 mg/kg semanalmente. En algunas modalidades, la cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es de 20, 25 o 30 mg/kg cada dos semanas. En otras modalidades, la cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es de 20 mg/kg cada dos semanas. En modalidades alternativas, la cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es de 20 mg/kg cada tres semanas. En incluso otras modalidades, la cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es de 30 mg/kg cada tres semanas. En modalidades adicionales, la cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es de 40 mg/kg cada cuatro semanas. En algunas modalidades, la cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 es una dosis inicial de 20, 25 o 30 mg/kg, seguida de una dosis más baja de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2.

Como se conoce en la técnica, los ADC pueden administrarse a los sujetos en dosis más bajas que las dosis usadas para la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2. En algunas modalidades, el ADC descrito en la presente (es decir, una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 enlazada a un análogo de auristatina) se administra de forma

5 semanal, bisemanal (Q2W), cada tres semanas (Q3W), o cada 4 semanas (Q4W). En algunas modalidades, la cantidad eficaz del ADC que puede administrarse a un sujeto con BTC está entre alrededor de 1 a alrededor de 15 mg/kg semanalmente, cada dos semanas o cada tres semanas. Tal como se indicó anteriormente, en modalidades específicas, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC puede administrarse por vía intravenosa. En una modalidad,

10 la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 puede administrarse mediante infusión IV en solución salina al 0.9 % durante 120 a 150 minutos. En una modalidad, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 puede administrarse mediante infusión IV en solución salina al 0.9 % durante 90 minutos. En una modalidad, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 puede administrarse mediante infusión IV en solución salina al

15 0.9 % durante 60 minutos. En modalidades relacionadas, la velocidad de infusión no puede superar los 250 mL de solución salina normal por hora.

En la presente también se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que tiene un BTC que comprenden administrar una cantidad eficaz de una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC junto con tratamientos antitumorales adicionales. Los tratamientos

20 antitumorales adicionales pueden seleccionarse de uno o más tratamientos para el BTC que incluyen quimioterapia sistémica tal como gemcitabina sola o con un agente quimioterapéutico a base de platino, quimiorradiación a base de fluoropirimidina, radioterapia sin quimioterapia adicional, y agentes en investigación (es decir, aquellos que actualmente se someten a ensayos clínicos, pero que aún no han sido aprobados por la FDA). En una modalidad, el método para

25 tratar a un sujeto que tiene BTC comprende administrar una cantidad eficaz de una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC junto con gemcitabina y cisplatino, o junto con gemcitabina y oxaliplatino. En una modalidad, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC puede administrarse junto con un fármaco de fluoropirimidina y un

30 fármaco a base de platino. Los ejemplos de fármacos de fluoropirimidina incluyen, de modo no taxativo, fluorouracilo, (5-FU), capecitabina o gemcitabina. Los ejemplos de fármacos a base de platino incluyen, de modo no taxativo, cisplatino y oxaliplatino. En otras modalidades, la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC puede administrarse junto con 5-FU, oxaliplatino y leucovorina. En incluso otras modalidades donde el sujeto tiene un BTC que

35 es MSI-H/dMMR (altos niveles de inestabilidad de microsatélite/reparación de errores de emparejamiento deficientes), la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC puede administrarse junto con un inhibidor del punto de control inmunitario tal como el anticuerpo anti-PD1 pembrolizumab (Keytruda™) o el anticuerpo anti-PD-L1 atezolizumab (TECENTRIQ®).

Los tratamientos antitumorales adicionales para el BTC se conocen en la técnica, tal como se describe en la Tabla 2 de Simile et ál. (2019) Medicina 55: 42. Un experto en la técnica podría identificar cuáles de estos tratamientos pueden administrarse junto con la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o los ADC que se describen en la presente.

- 5 Los tratamientos antitumorales adicionales descritos en los párrafos anteriores pueden administrarse junto con la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC, o puede administrarse de forma secuencial.

En algunas modalidades, el resultado de proporcionar una cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 a un sujeto que tiene un BTC es reducir una o más lesiones, inhibir el crecimiento de las una o más lesiones, aumentar el tiempo de evolución de las una o más lesiones, prolongar la supervivencia libre de la enfermedad del sujeto, disminuir las metástasis, aumentar la supervivencia sin evolución del sujeto o aumentar la supervivencia general del sujeto o aumentar la supervivencia general de un grupo de sujetos que reciben el tratamiento. En modalidades relacionadas, el resultado de proporcionar una cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 a un sujeto es una respuesta parcial (PR) o enfermedad estable (SD) en el sujeto, según se mide mediante las pautas revisadas de los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) (versión 1.1) [Eur J Ca 45:228-247, 2009]. En sujetos que tienen enfermedad metastásica y una CR o PR, también puede medirse la duración de la respuesta.

- 20 Tal como se usa en la presente, la expresión «enfermedad progresiva» (PD) hace referencia a la aparición de una o más lesiones y/o evolución inequívoca de lesiones no diana existentes. La PD puede declararse en base a la «evolución inequívoca» en casos donde la carga tumoral total aumenta significativamente lo suficiente como para requerir un cambio en la terapia; en la mayoría de los casos, un aumento modesto en el tamaño de una o más lesiones no diana no es suficiente para calificar (especialmente, en presencia de SD o PR en la enfermedad diana).

25 Tal como se usa en la presente, la expresión «respuesta parcial» (PR) hace referencia a una disminución de 30 % en la suma de los diámetros de las lesiones diana (que incluyen los ejes cortos de cualquier ganglio linfático diana), tomando como referencia el diámetro de la suma de referencia.

30 Tal como se usa en la presente, la expresión «respuesta completa» (CR) hace referencia a la desaparición de todas las lesiones no diana, la normalización del nivel de marcadores tumorales (si los marcadores tumorales se miden y están inicialmente por encima del límite superior de lo normal, estos deben normalizarse para que un paciente se considere con respuesta clínica completa). Todos los ganglios linfáticos deben ser < 10 mm (eje corto).

35 Tal como se usa en la presente, la expresión «enfermedad estable» (SD) hace referencia a un encogimiento no suficiente de las lesiones diana para calificar como PR o a un aumento no suficiente para calificar como PD, si se toma como referencia el diámetro de la suma más

pequeño desde que se inició el tratamiento.

Tal como se usa en la presente, la expresión «tasa de respuesta objetiva» (ORR) es la proporción de todos los pacientes aleatorizados que reciben cualquier cantidad del medicamento del estudio con PR o CR de acuerdo con la RECIST v 1.1 desde el inicio del tratamiento hasta la evolución/recurrencia de la enfermedad (si se toma como referencia para PD las mediciones más pequeñas registradas desde el inicio del tratamiento).

Tal como se usa en la presente, la expresión «supervivencia general» (OS) hace referencia al tiempo desde la fecha de aleatorización hasta la fecha de muerte por cualquier causa.

Tal como se usa en la presente, la expresión «supervivencia libre de evolución» (PFS) hace referencia al paciente que permanece vivo, sin la evolución o empeoramiento del cáncer. En una modalidad, la PFS se define como el tiempo desde la aleatorización en el estudio hasta la primera documentación radiográfica de evolución objetiva, tal como se define en RECIST (versión 1.1) o la muerte por cualquier causa. Se considerará que los pacientes que mueren sin una evolución previa informada han evolucionado el día de su muerte. Los pacientes que no evolucionaron o no se logra su seguimiento serán censurados el día de su última evaluación radiográfica del tumor.

Tal como se usa en la presente, la expresión «supervivencia libre de enfermedad» (DFS) hace referencia a la cantidad de tiempo después de que finaliza el tratamiento primario para un cáncer en que el paciente sobrevive sin signos o síntomas de ese cáncer. La DFS también puede denominarse «supervivencia sin recidiva» (RFS).

Tal como se usa en la presente, la expresión «tiempo hasta la evolución» (TTP) hace referencia a la cantidad de tiempo desde la fecha del diagnóstico o el inicio del tratamiento para un cáncer hasta que el cáncer comienza a empeorar o a diseminarse hacia otras partes del cuerpo.

Tal como se usa en la presente, la expresión «tasa de control de la enfermedad» (DCR) hace referencia a la falta de evolución de la enfermedad y su tasa. Se refiere al grupo de pacientes con una mejor respuesta general categorizada como CR, PR o SD (específicamente a los pacientes con PD), en donde la mejor respuesta general es la mejor respuesta registrada desde el inicio del tratamiento hasta PD.

Tal como se usa en la presente, la expresión «duración de la respuesta general» (DOR) hace referencia al período medido desde el momento en que se cumplen los criterios de medición para la respuesta completa o parcial (cualquiera sea el estado registrado primero) hasta la primera fecha en la que se documenta objetivamente la enfermedad recurrente o progresiva, si se toman como referencia las mediciones más pequeñas registradas desde el inicio del tratamiento.

En algunas modalidades, el resultado de proporcionar una cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC a un sujeto que tiene un BTC es un aumento de la tasa de control de la enfermedad (DCR) en un grupo de sujetos. La DCR puede ser útil para medir la eficacia de las terapias que tienen efectos tumoristáticos en vez de efectos tumoricidas.

La DCR se calcula como el porcentaje de pacientes que tienen un BTC que presenta CR, PR o SD después del tratamiento con el ADC o anti-HER2 biespecífico. En una modalidad, la administración de una cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC a los sujetos da como resultado una DCR mayor que 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 %. En otras modalidades, la administración de una cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC a los sujetos da como resultado una DCR mayor que 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 %. También es posible usar la PFS (supervivencia libre de evolución) y ORR (tasa de respuesta general) para determinar la eficacia de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC, y se mide de acuerdo con las pautas revisadas de RECIST 1.1 mencionadas anteriormente. La PFS se define como el tiempo desde la aleatorización hasta la evolución tumoral objetiva o la muerte. La ORR se define como la proporción de sujetos que tienen un BTC, que tienen una respuesta parcial o completa a la terapia con una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC. La ORR puede utilizarse como medida de la actividad tumorocida del fármaco. En algunas modalidades, el resultado de proporcionar una cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC a un sujeto que tiene BTC es un aumento de la supervivencia libre de evolución (PFS) en un grupo de sujetos. En algunas modalidades, el resultado de proporcionar una cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC a un sujeto que tiene BTC es un aumento de la tasa de respuesta general (ORR). En una modalidad, la administración de una cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC a los sujetos da como resultado una ORR mayor que 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 %. En aun otra modalidad, la administración de una cantidad eficaz de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC a los sujetos da como resultado una ORR mayor que 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 %. La supervivencia general, el tiempo hasta la evolución, la duración de la respuesta (DOR) también pueden usarse para determinar la eficacia de la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC.

Cuando la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC se administra como terapia adyuvante o neoadyuvante, también puede medirse la supervivencia libre de enfermedad para determinar la eficacia de la terapia.

Kits y artículos de fabricación

En la presente también se describen kits que comprenden una o más construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 o ADC. Los componentes individuales del kit se

pueden envasarse en recipientes separados y, asociado con dichos recipientes, puede haber un aviso de la forma prescrita por un organismo gubernamental que regula la elaboración, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, que puede reflejar la aprobación de la fabricación, el uso o la venta por parte del organismo. El kit puede contener, opcionalmente, instrucciones o indicaciones que describan el método de uso o el régimen de administración para la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC.

Cuando uno o más de los componentes del kit se proporcionan como soluciones, por ejemplo, una solución acuosa, o una solución acuosa estéril, los medios del recipiente pueden ser un inhalador, jeringa, pipeta, gotero para ojos u otros aparatos similares, a partir de los cuales se puede administrar la solución a un sujeto o aplicarla y mezclarla con los otros componentes del kit.

Los componentes del kit también pueden proporcionarse en forma seca o liofilizada y el kit puede contener adicionalmente un solvente adecuado para la reconstitución de los componentes liofilizados. Independientemente de la cantidad o el tipo de recipientes, los kits descritos en la presente también pueden comprender un instrumento para ayudar a la administración de la composición a un paciente. Tal instrumento puede ser un inhalador, un dispositivo de pulverización nasal, una jeringa, una pipeta, fórceps, una cuchara de medir, un gotero para ojos o vehículo de administración similar aprobado por médicos.

En otro aspecto descrito en la presente, se proporciona un artículo de elaboración que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico del BTC. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado a este. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden estar compuestos por una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que sola o combinada con otra composición es eficaz para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco con un tapón que pueda perforarse con una aguja hipodérmica). La etiqueta o el prospecto indican que la composición se utiliza en el tratamiento de la afección seleccionada. Asimismo, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente que contiene una composición que comprende una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 o ADC que se describe en la presente y (b) un segundo recipiente que contiene una composición que comprende un agente citotóxico o terapéutico en otra forma adicional. El artículo de fabricación en esta modalidad descrita en la presente puede comprender, además, un prospecto que indique que las composiciones pueden usarse para tratar el BTC. De manera alternativa o adicional, el artículo de fabricación puede comprender, además, un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de

Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir, además, otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

5 **Polipéptidos y polinucleótidos**

Las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 descritas en la presente comprenden al menos un polipéptido. Además, se describen polinucleótidos que codifican los polipéptidos descritos en la presente. Las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2 normalmente se aíslan.

- 10 Tal como se usa en la presente, «aislado» significa un agente (por ejemplo, un polipéptido o polinucleótido) que se identificó y se separó y/o se recuperó de un componente de su entorno de cultivo celular natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir en los usos de diagnóstico o terapéuticos para la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no
- 15 proteicos. Un aislado hace referencia también a un agente que se ha producido de forma sintética, por ejemplo, mediante intervención humana.

Los términos «polipéptido», «péptido» y «proteína» se utilizan de manera indistinta en la presente para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido se aplica de la misma forma a una descripción de un péptido y a una

20 descripción de una proteína y viceversa. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos de origen natural, así como también a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un aminoácido de origen no natural codificado. Tal como se usa en la presente, los términos comprenden cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, lo que incluye proteínas de longitud completa, en donde los residuos de aminoácidos están unidos mediante enlaces

25 peptídicos covalentes.

El término «aminoácido» hace referencia a aminoácidos de origen natural o de origen no natural, así como también a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos codificados de forma

30 natural son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina) y pirrolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos hacen referencia a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un

35 grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, tal como homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (tal como norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que el aminoácido de origen natural. La referencia a un aminoácido incluye, por ejemplo,

aminoácidos L proteogénicos de origen natural; aminoácidos D, aminoácidos modificados químicamente, tales como variantes y derivados de aminoácidos; aminoácidos no proteogénicos de origen natural, tales como β -alanina, ornitina, etc.; y compuestos sintetizados químicamente con propiedades conocidas en la técnica por ser características de los aminoácidos. Los ejemplos de aminoácidos de origen no natural incluyen, de modo no taxativo, aminoácidos α -metílicos (por ejemplo, α -metilalanina), aminoácidos D, aminoácidos similares a la histidina (por ejemplo, 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina), aminoácidos que tienen un metileno extra en la cadena lateral (aminoácidos «homo») y aminoácidos en los cuales un grupo funcional de ácido carboxílico en la cadena lateral se remplaza con un grupo de ácido sulfónico (por ejemplo, ácido cisteico). La incorporación de aminoácidos no naturales, que incluye aminoácidos no naturales sintéticos, aminoácidos sustituidos o uno o más D-aminoácidos en las proteínas descritas en la presente puede ser ventajosa de varias formas diferentes. Los péptidos que contienen aminoácidos D, etc., presentan estabilidad aumentada *in vitro* o *in vivo* en comparación con las contrapartes que contienen aminoácidos L. Por lo tanto, las construcciones de péptidos, etc., que incorporan aminoácidos D, pueden ser particularmente útiles cuando se desea o se necesita mayor estabilidad intracelular. Más específicamente, los péptidos D, etc., son resistentes a las peptidasas y proteasas endógenas, lo que proporciona de este modo una biodisponibilidad mejorada de la molécula y semividas prolongadas *in vivo* cuando se deseen dichas propiedades. Adicionalmente, los péptidos D, etc., no se pueden procesar de forma eficaz para la presentación restringida a los linfocitos T auxiliares por el complejo de histocompatibilidad principal clase II, y es, por lo tanto, menos probable que induzcan respuestas inmunitarias humorales en la totalidad del organismo.

En la presente puede hacerse referencia a los aminoácidos ya sea mediante los símbolos de tres letras conocidos comúnmente o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Biochemical Nomenclature Commission de IUPAC-IUB. De manera similar, puede hacerse referencia a los nucleótidos mediante sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

También se describen en la presente polinucleótidos que codifican polipéptidos de las construcciones biespecíficas de unión al antígeno anti-HER2. Se pretende que las expresiones «polinucleótido» o «secuencia de nucleótidos» indiquen un tramo consecutivo de dos o más moléculas de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos puede tener origen sintético, semisintético, genómico, en ADNc o en ARN, o cualquier combinación de estos.

La expresión «ácido nucleico» hace referencia a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, o ribonucleótidos y polímeros de estos, ya sea en forma de cadena simple o doble. A menos que se restrinja de manera específica, la expresión abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que poseen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se restrinja de otra manera específica, la expresión

también hace referencia a análogos de oligonucleótidos, que incluyen PNA (ácido peptidonucleico), análogos de ADN utilizados en tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforamidatos y similares). A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácidos nucleicos particular también comprende de manera implícita las variantes modificadas de manera conservadora de esta (que incluyen, de modo no taxativo, sustituciones de codones redundantes) y secuencias complementarias, así como también la secuencia indicada de manera explícita. De manera específica, las sustituciones de codones redundantes pueden lograrse mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxinosina (Batzer et ál., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et ál., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et ál., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

«Variantes modificadas de manera conservadora» se aplica a secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, «variantes modificadas de manera conservadora» hace referencia a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degradación del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína determinada. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en donde una alanina se especifica por un codón, el codón se puede alterar para obtener cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácidos nucleicos son «variaciones silenciosas», que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente que codifica un polipéptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Un experto en la técnica reconocerá que cada codón de un ácido nucleico (excepto AUG, que comúnmente es el único codón para la metionina, y TGG, que comúnmente es el único codón para el triptófano) puede modificarse para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto en la técnica reconocerá que las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales a una secuencia de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos o proteínas que modifique, agregue o elimine un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una «variante modificada de manera conservadora», donde la modificación da como resultado la eliminación de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Los expertos en la técnica conocen tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes modificadas de

manera conservadora son adicionales y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos descritos en la presente.

Los expertos en la técnica conocen tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y [0139] 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2.^a edición (diciembre de 1993))

Los términos «idéntico» o porcentaje de «identidad», en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, hacen referencia a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son «sustancialmente idénticas» si tienen un porcentaje de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales (es decir, alrededor de 60 % de identidad, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 % o alrededor de 95 % de identidad en una región específica), cuando se comparan y alinean para obtener la correspondencia máxima con respecto a una ventana de comparación o región designada, tal como se midió mediante el uso de uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias (u otros algoritmos disponibles para los expertos en la técnica) o mediante alineación manual e inspección visual. Esta definición también hace referencia al complemento de una secuencia de prueba. La identidad puede existir con respecto a una región con una longitud de al menos alrededor de 50 aminoácidos o nucleótidos o con respecto a una región con una longitud de 75-100 aminoácidos o nucleótidos o, cuando no se especifique, en toda la secuencia de un polinucleótido o polipéptido. Puede obtenerse un polinucleótido que codifique un polipéptido descrito en la presente, lo que incluye homólogos de especies diferentes a la humana, mediante un proceso que comprende las etapas de analizar una biblioteca en condiciones rigurosas de hibridación con una sonda marcada que tiene una secuencia de polinucleótidos descrita en la presente o un fragmento de esta, y aislar el ADNc de longitud completa y los clones genómicos que contienen dicha secuencia de polinucleótidos. Dichas técnicas de hibridación son conocidas por el experto en la técnica.

En el caso de comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencias. Pueden utilizarse los parámetros predeterminados del programa o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula luego el porcentaje de identidad de secuencia para las

secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, según los parámetros del programa.

Un espectro de comparación, tal como se usa en la presente, incluye la referencia a un segmento de cualquier cantidad de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en 20 a 600, usualmente, alrededor de 50 a alrededor de 200, más usualmente alrededor de 100 a alrededor de 150, en las cuales una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia con la misma cantidad de posiciones contiguas después de la alineación óptima de ambas secuencias. Los expertos en la técnica conocen los métodos para alinear las secuencias para su comparación. La alineación óptima de secuencias para su comparación se puede llevar a cabo, incluso, de modo no taxativo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante la búsqueda para el método de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel et ál., *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento de 1995)).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et ál. (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 y Altschul et ál. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. El software para la realización de los análisis BLAST se encuentra disponible al público a través del sitio web del National Center for Biotechnology Information en internet en ncbi.nlm.nih.gov. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y alineaciones de matriz de puntaje BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST se lleva a cabo normalmente con el filtro de «complejidad baja» apagado.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la menor probabilidad de suma en una

comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que alrededor de 0.2 o menor que alrededor de 0.01 o menor que alrededor de 0.001.

La expresión «se hibrida de manera selectiva (o específica) con» hace referencia a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula únicamente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas de hibridación cuando dicha secuencia se encuentra presente en una mezcla de complejos (que incluye, de modo no taxativo, la totalidad de ADN o ARN celular o de biblioteca).

La expresión «condiciones rigurosas de hibridación» hace referencia a la hibridación de secuencias de ADN, ARN u otros ácidos nucleicos o combinaciones de estos en condiciones de baja resistencia iónica y temperatura elevada, tal como se conoce en la técnica. Típicamente, en condiciones rigurosas, una sonda se hibridará a su subsecuencia diana en una mezcla de complejos de ácido nucleico (que incluye, de modo no taxativo, la totalidad de ADN o ARN celular o de biblioteca), pero no se hibrida con otras secuencias en la mezcla de complejos. Las condiciones rigurosas dependen de las secuencias y difieren según las circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan de forma específica a temperaturas más elevadas. Una guía amplia para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Probes, «Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays» (1993).

Tal como se usan en la presente, se considera que las expresiones «modificar o modificado genéticamente y modificación genética» incluyen cualquier manipulación de la estructura del péptido o modificaciones postraduccionales de un polipéptido recombinante o de origen natural, o un fragmento de este. La modificación genética incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glicosilación o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de dichos enfoques. Las proteínas modificadas genéticamente son expresadas y producidas mediante técnicas estándares de biología molecular.

Se prevé que «polinucleótido o molécula de ácido nucleico aislado» es una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha eliminado de su entorno natural. Por ejemplo, se considera aislado un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido contenido en un vector. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospedadoras heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en una solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula de polinucleótido contenida en las células que comúnmente contienen la molécula de polinucleótido, pero la molécula de polinucleótido está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural. Las moléculas aisladas de ARN incluyen transcripciones de ARN *in vivo* o *in vitro*, así como formas de cadena positiva y negativa y formas de cadena doble. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados descritos en

la presente incluyen, además, dichas moléculas producidas sintéticamente, por ejemplo, mediante síntesis química o PCR. Adicionalmente, un polinucleótido o un ácido nucleico incluye, en determinadas modalidades, un elemento de regulación tal como un promotor, sitios de unión a ribosomas o un terminador de la transcripción.

- 5 Las expresiones «reacción en cadena de la polimerasa» o «PCR» hacen referencia, en términos generales, a un método para la amplificación de una secuencia de nucleótidos deseada *in vitro*, tal como se describió, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4,683,195. En general, el método de PCR implica ciclos repetidos de síntesis de extensión de cebadores con cebadores oligonucleótidos capaces de hibridarse de forma preferencial con una plantilla de ácido nucleico.
- 10 Se pretende que al indicar un ácido nucleico o polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, 95 % «idéntica» a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención, la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En
- 15 otras palabras, para obtener un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, es posible eliminar hasta 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia o sustituirlos con otros nucleótidos, o es posible insertar una cantidad de nucleótidos hasta 5 % del total de nucleótidos en la secuencia de referencia en dicha secuencia de referencia. Dichas alteraciones de la secuencia de referencia pueden
- 20 producirse en las posiciones de los extremos 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre dichas posiciones en los extremos, espaciadas de forma individual entre los residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia. Desde el punto de vista práctico, puede determinarse de forma convencional si alguna secuencia de polinucleótidos en particular es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de la presente invención con
- 25 programas informáticos conocidos, tales como los descritos previamente para los polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).
- Se dice que un derivado o una variante de un polipéptido comparte «homología» o es
- 30 «homólogo» respecto al péptido si las secuencias de aminoácidos del derivado o variante tienen al menos 50 % de identidad con una secuencia de 100 aminoácidos a partir del péptido original. En determinadas modalidades, el derivado o variante es al menos 75 % idéntico al péptido o un fragmento del péptido que tiene la misma cantidad de residuos de aminoácidos que el derivado. En determinadas modalidades, el derivado o variante es al menos 85 % idéntico al péptido o un
- 35 fragmento del péptido que tiene la misma cantidad de residuos de aminoácidos que el derivado. En determinadas modalidades, la secuencia de aminoácidos del derivado es al menos 90 % idéntica al péptido o un fragmento del péptido que tiene la misma cantidad de residuos de aminoácidos que el derivado. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos del derivado

es al menos 95 % idéntica al péptido o un fragmento del péptido que tiene la misma cantidad de residuos de aminoácidos que el derivado. En determinadas modalidades, el derivado o variante es al menos 99 % idéntico al péptido o un fragmento del péptido que tiene la misma cantidad de residuos de aminoácidos que el derivado.

5 El término «modificado», tal como se usa en la presente, hace referencia a cualquier cambio realizado a un polipéptido dado, tal como cambios en la longitud del polipéptido, secuencia de aminoácidos, estructura química, modificación cotraduccional o modificación postraduccional de un polipéptido. La forma «(modificado)» del término significa que los polipéptidos que se tratan se modifican opcionalmente, es decir, los polipéptidos tratados pueden modificarse o no modificarse.

10 En algunos aspectos, una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos pertinente, o un fragmento de esta, indicada en una o más de las Tablas o números de registro que se describen en la presente. En algunos aspectos, una construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 aislada comprende una

15 secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que es al menos 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % idéntica a una secuencia de nucleótidos pertinente, o fragmento de esta, indicada en una o más de las Tablas o números de registro que se describen en la presente.

20 Se entenderá que la descripción no se limita a los protocolos, las líneas celulares, las construcciones y los reactivos particulares descritos en la presente y, por ello, pueden variar. También se entenderá que la terminología empleada en la presente tiene el fin de describir solamente modalidades particulares y no se pretende que limite el alcance de la presente descripción.

25 Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la presente se incorporan a esta en su totalidad mediante referencia a los efectos de describir y divulgar, por ejemplo, las construcciones y metodologías que se describen en las publicaciones, las cuales pueden usarse en relación con las construcciones que se describen en la presente. Las publicaciones que se mencionan en la presente se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de

30 la presente solicitud. Ningún contenido de la presente debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen el derecho a preceder dicha descripción en virtud de la invención previa o por cualquier otra razón.

35

TABLAS DE SECUENCIAS

Tabla 6: Números de clonación para las variantes v5019, v5020, v7091, v10000, v6903, v6902 y v6717

Variante	Clon H1 #	Clon H2 #	Clon L1 #	Clon L2 #
----------	-----------	-----------	-----------	-----------

5019	3057	720	1811	--
5020	719	3041	--	1811
7091	3057	5244	1811	--
10000	6586	5244	3382	--
6903	5065	3468	5037	3904
6902	5065	3468	5034	3904
6717	3317	720	--	--

Tabla 7: Secuencia para las variantes v5019, v5020, v7091, v10000, v6903, v6902 y v6717 por número de clon

SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
3	3468	Completa	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWRQAPGKG LEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARNLGPSFYFDYWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKGYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPISRDEL T KNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
4	3468	Completa	GAAGTGCAGCTGGTCTGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCA GGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGCCGCTAGTGGCTTCACTT TTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAA GGGCCTGGAGTGGGTGCGCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGG CTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTCACCCTGTCA GTGGACCGGAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCC TGCGAGCCGAAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCCGGAATCT GGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACCTCTG GTCACCGTGAGCTCCGCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCC CACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGGAACCTGCAGC CCTGGGCTGTCTGGTGAAGGGCTACTTCCCAGAGCCCGTCACA GTGTCTTGAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCT TTCCTGCAGTGCTGAAGTCAAGCGGGCTGTACAGCCTGTCCTC TGTGGTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTAT

SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5			ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAATACAAAAGTCGACAA GAAAGTGGAACCCAAGTCTTGTGATAAAACCCATACATGCCCC CTTGTCTGCAACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCT GTTTCCACCCAAGCCTAAAGATACACTGATGATTAGTAGGACCC CAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACC CCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCA TAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACAGTACC TATCGCGTCGTGTCAGTCCTGACAGTGCTGCATCAGGATTGGC TGAACGGGAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCTCT GCCCCGACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCAAAGGACAG CCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCATCAAGGGATG AGCTGACAAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGG ATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAATGGCC AGCCTGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTC AGATGGCAGCTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTCGACAAAT CCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTTCAGTCATGCA CGAGGCACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTG TCACCAGGG
25	5	3468	VH
			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKG LEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS
30	6	3468, 3057, 3041, 3317	H1
			GFTFTDYT
35	7	3468, 3057, 3041, 3317	H3
			ARNLGPSFYFDY
	8	3468, 3057, 3041, 3317	H2
			VNPNSGGS
	9	1811	Comp
			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPK

SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5		leta	LLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQY YIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	1811	Comp leta	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAG TGGGCGACCGAGTCACCATCACATGCAAGGCTTCCCAGGATGT GTCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCA CCCAAGCTGCTGATCTATAGCGCCTCCTACCGGTATACCGGCG TGCCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTGAGAACAGACTTTACT CTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACCTACTA TTGCCAGCAGTACTATATCTACCCATATACCTTTGGCCAGGGGA CAAAGTGGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTT CATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGCCA GCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAAGCCAAA GTGCAGTGAAGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAACAGC CAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAG CCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCAGACTACGAGAAG CACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTCACACATCAGGGGCTGTCCT CTCCTGTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
25	11	1811 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQDVSIGVAWYQKPGKAPK LLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQY YIYPYTFGQGTKVEIK
30	12	1811, 3904, 3317 L1	QDVSIG
	13	1811, 3904, 3317 L3	QQYYIYPYT
35	14	1811, 3904, 3317 L2	SAS
	15	5034 Comp leta	DYKDDDDKDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDERLKSGTA

SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5			SVVCLLNNFYPBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	16	5034	Completa
15			GACTACAAAGACGACGATGACAAAGATATCCAGATGACCCAGT CCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTCACTAT TACCTGCCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCGCCTGG TACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGCTGCTGATCTACA GTGCATCATTCCTGTATTCAGGAGTGCCCAGCCGGTTTAGCGG CAGCAGATCTGGCACCGATTTCACTGACTATTTCTAGTCTGC AGCCTGAGGACTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTATAACC ACACCCCCTACTTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAGC GAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGAT 20
25	17	5034	VL
30			DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIK
35	18	5037	Completa
			DYKDDDDKDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDERLKSGTA SVVCLLNNFYPBREAKVQWKVDNALQSGNSKESVTEQDSKDSTYS LSSRLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	19	5037	Completa
			GACTACAAAGACGACGATGACAAAGATATCCAGATGACCCAGT CCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTCACTAT TACCTGCCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCGCCTGG TACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGCTGCTGATCTACA GTGCATCATTCCTGTATTCAGGAGTGCCCAGCCGGTTTAGCGG CAGCAGATCTGGCACCGATTTCACTGACTATTTCTAGTCTGC AGCCTGAGGACTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTATAACC ACACCCCCTACTTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAGC

SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5			GAAGTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGAT GAAAGACTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGTGGTCTGTCTGCTGA ACAATTTTTACCCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGA CAACGCTCTGCAGAGTGGCAACAGCAAGGAGAGCGTGACAGAA CAGGATTCCAAAGACTCTACTTATAGTCTGTCAAGCAGACTGAC ACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGT 10 GAGGTCACACATCAGGGGCTGTCATCACCAGTCACCAAATCATT CAATCGGGGGGAGTGC
15	20	5037	VL
			DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIK
	21	5037	L1
			QDVNTA
	22	5037	L3
			QQHYTTPPT
	23	5037	L2
			SAS
20	24	3382	Completa
			DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQY YIYPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
25	25	3382	Completa
			GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAG TGGGCGACCGAGTCACCATCACATGCAAGGCTTCCCAGGATGT GTCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAAAGCA CCCAAGCTGCTGATCTATAGCGCCTCCTACCGGTATACCGGCG TGCCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTGAGAACAGACTTTACT CTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTCGCTACCTACTA TTGCCAGCAGTACTATATCTACCCAGCCACCTTTGGCCAGGGG 30 ACAAAGTGGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCT TCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGCC AGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAAGCCAA AGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAACAGC 35 CAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAG CCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCAGACTACGAGAAG CACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTCACACATCAGGGGCTGTCCT CTCCTGTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT

	SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5	26	3382	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQY YIYPATFGQGTKVEIK
	27	3382	L1	QDVSIG
	28	3382	L3	QQYYIYPAT
	29	3382	L2	SAS
10	30	5065	Comp leta	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK 15
20	31	5065	Comp leta	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
25				GAGGTGCAGCTGGTCGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCA GGAGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGCTTCAACA TCAAGGACACCTACATTCAGTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGAAA AGGCCTGGAGTGGGTGGCACGAATCTATCCAATAATGGATAC ACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATTTCTG 25
30				CAGATACAAGTAAAAAACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGAGCCGAAGATACAGCCGTGTACTATTGCAGCCGATGGGGAG GCGACGGCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGCAGGGAACCCT GGTCACAGTGAGCTCCGCATCAACAAAGGGGCCTAGCGTGTTT 30
35				CCACTGGCCCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGGGGAACAGCAG CCCTGGGATGTGAGGTGACCGACTACTTCCCAGAGCCCGTCAC TGTGAGCTGGAACCTCCGGCGCCCTGACATCTGGGGTCCATACT TTTCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCT CTGTGGTCACTGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGGACTCAGACCTA TATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAATACCAAAGTCGACA AGAAAGTGGAACCCAAGTCTTGTGATAAAACACATACTTGCCCC 35
				CCTTGTCCTGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGATGATTAGTAGGACT

	SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5				CCAGAAGTCACCTGCGTGGTTCGTGGACGTGAGCCACGAGGAC CCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCAC TTATCGCGTCGTGTCTGTCTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCTC TGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCTAAAGGGCA 10GCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCCTCCATCTAGGGAC GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGTCTGACATGTCTGGTGAAAG GGTTCTATCCCAGCGATATCGCAGTGGAGTGGGAATCCAATGG ACAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGAC TCTGATGGAAGTTTCGCCCTGGTGAGTAAGCTGACCGTCGATA 15AATCACGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGTTTCAGTGAT GCACGAAGCACTGCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCC CTGTCCCCCGGC
20	32	5065	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
	33	5065, 720, 719	H1	GFNIKDTY
25	34	5065, 720, 719	H3	SRWGGDGFYAMDY
	35	5065, 720, 719	H2	IYPTNGYT
30				
35	36	6586	Completa	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYTMDWVRQAPGK GLEWVGDVNPNSGGSINQRFKGRFTFSVDRSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVPPSRD

SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5			ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
10	37	Comp leta	GAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGAGGGGGCCTGGTGCAGCCC GGAGGGTCTCTGCGACTGTCATGTGCCGCTTCTGGGTTCACCT TCGCAGACTACACAATGGATTGGGTGCGACAGGCCCGGAAA GGGACTGGAGTGGGTGGGCGATGTCAACCCTAATTCTGGCGG GAGTATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGGAGATTCACTTTTTCAG TGGACAGAAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCT GAGGGCCGAAGATACCGCTGTCTACTATTGCGCTCGCAATCTG GGCCCCAGTTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACCCTGG 15 TGACAGTCAGCTCCGCTAGCACTAAGGGGCCTTCCGTGTTTCC ACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCA CTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACAGT GAGTTGGAAGTCAAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTT CCCGCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTG 20 TGGTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGACAAGA AAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATACCTGCCCACC TTGTCCGGCGCCAGAAGTCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCTCTG TTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGATGATTTCCCGGACTCC 25 TGAGGTACCTGCGTGGTCTGACGTGTCTCACGAGGACCCC GAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAAGTGCATA ATGCCAAGACCAAACCCCGGGAGGAACAGTACAACCTCTACCTA TAGAGTCGTGAGTGTCTGACAGTGTCTGACACAGGACTGGCTG 30 AATGGGAAGGAGTATAAGTGTAAAGTGAGCAACAAAGCCCTGC CCGCCCCAATCGAAAAACAATCTCTAAAGCAAAGGACAGCCT CGCGAACCACAGGTCTACGTCTACCCCCATCAAGAGATGAAC TGACAAAAAATCAGGTCTCTCTGACATGCCTGGTCAAAGGATTC TACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAACGGCCAGC 35 CCGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTCCTGGACTCTGAT GGGAGTTTCGCTCTGGTGTCAAAGCTGACCGTCGATAAAAGCC GGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTTAGCTGCTCCGTCATGCACGA AGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGAGCCTGAGC

	SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5				CCTGGC
	38	6586	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYTMDWVRQAPGK GLEWVGDVNPNSGGSIYNQRFKGRFTFSVDRSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
	39	6586	H1	GFTFADYT
10	40	6586	H3	ARNLGPSFYFDY
	41	6586	H2	VNPNSGGS
15	42	3904	Completa	YPYDVPDYATGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVA WYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQ EDFATYYCQQYIYPYTFGQGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEELKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSEESVTEQDSKDS TYSLSSTLELSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	43	3904	Completa	TATCCCTACGATGTGCCTGACTACGCTACTGGCTCCGATATCCA GATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCTGAGTGATCAGTGGGGGAC CGAGTCACCATCACATGCAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTG GAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGCT GCTGATCTACAGCGCCTCCTACCGGTATACTGGGGTGCCTTCC AGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGAACCGACTTTACTCTGACCAT CTCTAGTCTGCAGCCCGAGGATTTGCCACCTACTATTGCCAG CAGTACTATATCTACCCTTATACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGT GGAGATCAAGAGGACAGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTTC CCCCTTCCGACGAAGAGCTGAAAAGTGGAAGTCTTCAGTGGT CTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCCCGCGAAGCCAAAGTGCAGT GGAAGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAATTCCGAGGAGTC TGTGACAGAACAGGACAGTAAAGATTCAACTTATAGCCTGTCAA GCACACTGGAGCTGTCTAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGT GTATGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGGCTGTCCTCTCCCGTG ACAAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
35	44	3904	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQY YIYPYTFGQGGTKVEIK
	45	719	Completa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESG

SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5			GGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTYPPSRDELTKNQVSLTCLVK 10 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDEEDGSFALVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	46	719	Comp leta
20			GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACGTT AACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTC CCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTCGATCTGGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACT GTCAACAGCATTACACTACCCCAACCACTTTGCGCCAAGGGAC CAAAGTGGAGATCAAAGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGT 25 GGTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGAAGTGCAGC TGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACATTAAAGATACT TATATCCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGT GGGTCGCACGTATTTATCCCACAAATGGTTACACACGGTATGCG GACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCGCAGACACTTCCA AGAACACCGCGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGA CACGGCCGTTTATTACTGTTCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTC TACGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCT 30 CCTCAGCCGCCGAGCCCAAGAGCAGCGATAAGACCCACACCT GCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGT GTTCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGATTTCCA GGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACG AGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGA AGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC 35 CCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAG GCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAG

	SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5				GCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACATACCCACCCAGCA GAGACGAACTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGT GAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAA ATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCTCCAGTGCT GGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGTCCAAGCTGACAGT GGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTCA 10 GTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCT GTCCCTGTCTCCCGGCAAA
15	47	719	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIK
	48	719	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
20	49	720	Completa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD 25 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLICLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	50	720	Completa	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACGTT AACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTC CCATCAAGGTTCACTGGCAGTCGATCTGGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACT GTCAACAGCATTACACTACCCACCCACTTTCGGCCAAGGGAC CAAAGTGGAGATCAAAGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGT 35 GGTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGAAGTGCAGC

	SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5				TGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACATTAAAGATACT TATATCCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGT GGGTGCGACGTATTTATCCCACAAATGGTTACACACGGTATGCG GACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCGCAGACACTTCCA AGAACACCGCGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGA CACGGCCGTTTATTACTGTTCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTC TACGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCT CCTCAGCCGCCGAGCCCAAGAGCAGCGATAAGACCCACACCT GCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGT GTTCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGATTTCCA GGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACG AGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGA AGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAG GCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAG GCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCCAGCA GAGACGAACTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGATCTGTCTGGT GAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAA ATGGACAGCCAGAGAACAGATACATGACCTGGCCTCCAGTGCT GGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTATTCCAAGCTGACAGTG GATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTCACT GATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGT CCCTGTCTCCCGGCAAA
30	51	720	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIK
35	52	720	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
	53	3041	Completa	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVRQAPGKG LEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS

SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5			KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPISRDEL T 10 KNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
54	3041	Completa	GAAGTGCAGCTGGTCTGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCA GGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGCCGCTAGTGGCTTCACTT TTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAA GGGCCTGGAGTGGGTGCGCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGG 15 CTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTCACCCTGTCA GTGGACCGGAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCC TGCAGCCGAAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCCGGAATCT GGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAAGTCTG GTCACCGTGAGCTCCGCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCC 20 CACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGGAAGTGCAGC CCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACA GTGTCTTGGAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCT TTCCTGCAGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACAGCCTGTCCTC TGTGGTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTAT 25 ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAATACAAAAGTCGACAA GAAAGTGGAACCCAAGTCTTGTGATAAAACCCATACATGCCCC CTTGTCTGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCT GTTTCCACCCAAGCCTAAAGATACACTGATGATTAGTAGGACCC 30 CAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACC CCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCA TAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACAGTACC TATCGCGTCGTGTGAGTCTGACAGTGCTGCATCAGGATTGGC TGAACGGGAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCTCT 35 GCCCCGACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCAAAAGGACAG CCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCATCAAGGGATG AGCTGACAAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGG ATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAATGGCC

	SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5				AGCCTGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTC AGATGGCAGCTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTCGACAAAT CCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTTCAGTCATGCA CGAGGCACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTG TCACCAGGG
10	55	3041	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKG LEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARNLGPSFYFDYWQGTLTVSS
15	56	3057	Completa	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKG LEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARNLGPSFYFDYWQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF ALVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
20	57	3057	Completa	GAAGTGCAGCTGGTCTGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCA GGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGCCGCTAGTGGCTTCACTT TTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAA GGGCCTGGAGTGGGTGCGCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGG CTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTCACCCTGTCA GTGGACCGGAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCC TGCGAGCCGAAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCCGGAATCT GGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACCTCTG GTCACCGTGAGCTCCGCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCC CACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGGAACCTGCAGC CCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACA GTGTCTTGGAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCT TTCCTGCAGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACAGCCTGTCCTC TGTGGTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTAT ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAATACAAAAGTCGACAA GAAAGTGGAACCCAAGTCTTGTGATAAAACCCATACATGCCCCC
25				
30				
35				

	SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5				CTTGTCCTGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCTCT GTTTCCACCCAAGCCTAAAGATACTGATGATTAGTAGGACCC CAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACC CCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCA TAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACAGTACC TATCGCGTCGTGTCAGTCCTGACAGTGCTGCATCAGGATTGGC 10 TGAACGGGAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCTCT GCCCCGACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCCAAAAGGACAG CCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGTATCCTCCATCAAGGGATG AGCTGACAAAGAACCAGGTCAGCCTGACTTGTCTGGTGAAAGG ATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAATGGCC 15 AGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTC AGATGGCAGCTTCGCGCTGGTGAGCAAGCTGACCGTCGACAAA TCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTTCAGTCATGC ACGAGGCACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACT GTCACCAGGG
20	58	3057	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKG LEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
25	59	3317	Completa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQY YIYPYTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKLEWVADVNPNSG GSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLG PSFYFDYWGQGTLVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSV 30 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGFSFALVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
35	60	3317	Completa	GACATTCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCCCTGAGTGCCTCAG TCGGGGACAGGGTGACTATCACCTGCAAGGCTTCACAGGATGT CAGCATTGGCGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGC ACCCAAGCTGCTGATCTATAGCGCCTCCTACAGGTATACAGGC

	SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5				GTGCCATCCCGCTTCTCTGGCAGTGGGTCAGGAACTGACTTTA CACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCCCGAAGATTTGCCACATAC TATTGCCAGCAGTACTATATCTACCCTTATACTTTTGGCCAGGG GACCAAAGTGGAGATTAAGGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGG AGGGTCTGGAGGAGGAGGAAGTGAGGTCCAGCTGGTGGAAATC TGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGAGGCTGTC 10 TTGTGCCGCTAGTGGCTTCACCTTTACAGACTACACAATGGATT GGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAATGGGTGCGCTG ATGTGAACCCTAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTT CAAAGGACGGTTCACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAGAACACC CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGATACTGCTG 15 TGTACTATTGCGCCAGGAATCTGGGCCCAAGCTTCTACTTTGAC TATTGGGGGCAGGGAACACTGGTCACTGTGTCAAGCGCAGCCG AACCCAAATCCTCTGATAAGACTCACACCTGCCACCTTGTCCA GCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTTCCAC CCAAGCCAAAAGACACTCTGATGATTTCTAGAACCCCTGAAGTG 20 ACATGTGTGGTCGTGGACGTCAGTCACGAGGACCCCGAAGTCA AATTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAA GACCAAACCCCGAGAGGAACAGTACAACCTATCGGGTC GTGAGCGTCCTGACAGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCA AGGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAACAAGGCTCTGCCTGCACC 25 AATCGAGAAGACCATTTCCAAGGCTAAAGGGCAGCCCCGCGAA CCTCAGGTCTACGTGTATCCTCCAAGCCGAGATGAGCTGACAA AAAACCAGGTCTCCCTGACTTGTCTGGTGAAGGGATTTTACCCA AGTGACATCGCAGTGGAGTGGGAATCAAATGGCCAGCCCGAAA 30 ACAATTATAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGGAGT TTCGCACTGGTCTCCAACTGACCGTGGACAAGTCTCGGTGGC AGCAGGGAAACGTCTTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAGGCCCT GCACAATCATTACACACAGAAATCTCTGAGTCTGTCACCTGGCA AG
35	61	3317	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQY YIYPYTFGQGTKVEIK
	62	3317	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKG

SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5			LEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARNLGPSFYFDYWGGQGLVTVSS
10	63	5244	Completa
15			DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYVLPISRDELTKNQVSLCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
20	64	5244	Completa
25			GACATTCAGATGACACAGAGCCCCAGCTCCCTGAGTGCTTCAG TCGGCGACAGGGTGACTATCACCTGCCGCGCATCCCAGGATGT CAACACCGCTGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAAGCC CCAAAGCTGCTGATCTACAGCGCTTCCTTCCTGTATTCTGGCGT GCCAAGTCGGTTTTCTGGAAGTAGATCAGGCACTGACTTCACAC TGACTATCTCTAGTCTGCAGCCCGAAGATTTTGCCACCTACTAT TGCCAGCAGCACTATAACCACACCCCCTACATTCGGACAGGGCA CTAAAGTGGAGATTAAGGGCGGGTCAGGCGGAGGGAGCGGAG GAGGGTCCGGAGGAGGGTCTGGAGGAGGGAGTGGAGAGGTC CAGCTGGTGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGC TCACTGCGACTGAGCTGTGCCGCTTCGGCTTTAACATCAAAGA CACATACATTCATTGGGTGAGGCAGGCAGCAGGGAAGGGACTG GAATGGGTGGCCCGCATCTATCCCACAAATGGGTACACTCGAT ATGCCGACAGCGTGAAAGGACGGTTTACCATTTCTGCTGATACC AGTAAGAACACAGCATACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCAG AGGATACAGCCGTGTACTATTGCAGTCGATGGGGGGGAGACG GCTTCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGGACTCTGGTCAC CGTGTCAAGCGCAGCCGAACCTAAATCCTCTGACAAGACCCAC ACATGCCCACCCTGTCCTGCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCAT CCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAAGATACACTGATGATT AGCCGCACTCCCGAAGTCACCTGTGTGGTTCGTGGACGTGTCCC
35			

	SEQ ID NO.	Clon #	Desc	Secuencia (aminoácido o ADN)
5				ACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT CGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCAAGAGAGGAACAGTAC AATTCAACCTATAGGGTCGTGAGCGTCCTGACAGTGCTGCATCA GGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAAC AAGGCCCTGCCCCGCTCCTATCGAGAAGACTATTAGCAAGGCAA AAGGGCAGCCACGGGAACCCCAAGGTCTACGTGCTGCCCCCTA 10GCAGAGACGAGCTGACCAAAAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCT GGTGAAGGGCTTTTATCCTAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAA TCAAATGGGCAGCCAGAAAACAATTACCTGACATGGCCACCCG TGCTGGACAGCGATGGGTCCTTCTTTCTGTATTCCAACTGACT 15GTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGAAACGTCTTCAGCTGTT CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACCCAGAAGTC TCTGAGTCTGTCACCCGGC
20	65	5244	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIK
20	66	5244	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
25	67	5244, 5034, 719, 720	L1	QDVNTA
30	68	5244, 5034, 719, 720	L2	SAS
35	69	5244, 5034, 719, 720	L3	QQHYTTPPT
	70	5244	H1	GFNIKDTY
	71	5244	H2	IYPTNGYT
	72	5244	H3	SRWGGDGFYAMDY

EJEMPLOS

A continuación, figuran ejemplos de modalidades específicas para preparar y usar la construcción biespecífica de unión al antígeno anti-HER2 y los ADC que se describen en la presente. Los ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la descripción de forma alguna. Se han llevado a cabo esfuerzos para asegurar la exactitud de los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales.

Las construcciones y métodos que se describen en la presente pueden prepararse y llevarse a cabo mediante el empleo, a menos que se indique lo contrario, de métodos convencionales de química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la técnica. Estas técnicas se explican de forma exhaustiva en la bibliografía. Véase, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., adición actual); Sambrook, et ál., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.ª edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey y Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3.ª Ed. (Plenum Press) tomo A y B(1992).

Ejemplo 1: Descripción y preparación de la variante 10000 (v10000)

v10000 es un anticuerpo biespecífico humanizado que reconoce 2 epítomos no superpuestos del ECD del antígeno HER2 humano. La región Fc similar a IgG1 de v10000 contiene mutaciones complementarias en cada dominio CH3 que imparte emparejamiento preferencial para generar una molécula heterodimérica y desfavorecer, en consecuencia, la formación de homodímeros.

La Figura 1 ilustra una representación del formato v10000 donde la cadena pesada A y la cadena ligera A' forman la parte de unión a ECD2 del anticuerpo y la cadena pesada B comprende el scFv que forma la parte de unión a ECD4 del anticuerpo. La variante 10000 comprende una cadena pesada H1 (que corresponde a la cadena pesada A en la Figura 1) que comprende la secuencia indicada en la SEQ ID NO:36, una cadena pesada H2 (que corresponde a la cadena pesada B en la Figura 1) que comprende la secuencia indicada en la SEQ ID NO:63, y una cadena ligera L1 (que corresponde a la cadena ligera A') que comprende la secuencia indicada en la SEQ ID NO:24. Los métodos para preparar v10000 se describen detalladamente en la publicación de patente internacional n.º WO 2015/077891.

v10000 se fabricó de acuerdo con los requisitos reglamentarios pertinentes para ensayos en humanos y se formuló a 15 mg/mL en amortiguador acuoso biocompatible, para infusión IV a temperatura ambiente. v10000 se administró en un vial que contenía 300 mg de v10000 en 20 mL de amortiguador. Los viales de v10000 se transportaron congelados y se almacenaron

a -20 °C(+/-5 °C) hasta que estuvieron listos para su uso. Los viales se descongelaron a temperatura ambiente antes de su uso. Las soluciones descongeladas en viales se almacenaron hasta 24 horas a temperatura ambiente o hasta 72 horas en condiciones refrigeradas (2 °C a 8 °C) y se utilizaron antes de la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta.

5

Ejemplo 2: Ensayo clínico de fase I de v10000 en pacientes con cánceres localmente avanzados (no extirpables) y/o metastásicos con expresión de HER2

Este es un estudio en curso por primera vez en humanos para investigar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética (PK) y actividad antitumoral preliminar de la monoterapia con v10000 en pacientes con cánceres localmente avanzados (no extirpables) y/o metastásicos con expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2).

La parte 1 del estudio fue un aumento de la dosis de 3+3 que identificó 20 mg/kg Q2W de agente único como dosis recomendada (RD). La parte 2 está en curso y está evaluando la RD de v10000 en pacientes adicionales, incluidos pacientes con BTC con HER2 alto. Los pacientes elegibles en las partes 1 y 2 deben haber tenido evolución de la enfermedad después de todas las terapias que se sabe que confieren beneficio clínico. Las respuestas tumorales se evaluaron mediante revisión del investigador según RECIST v1.1 Q8W.

Objetivos

El objetivo primario de la parte 1 del ensayo clínico fue determinar la MTD (dosis máxima tolerada), OBD (dosis biológica óptima) o la RD de la monoterapia con v10000. Los objetivos secundarios de la parte 1 del ensayo clínico fueron (1) caracterizar la seguridad y tolerabilidad de v10000; (2) caracterizar el perfil de PK en suero de v10000; y (3) explorar los posibles efectos antitumorales de v10000 en pacientes elegibles con cánceres con expresión de HER2.

El objetivo primario de la parte 2 del ensayo fue caracterizar la seguridad y tolerabilidad de la monoterapia con v10000 en tipos de tumores específicos. Los objetivos secundarios de la parte 2 del ensayo clínico fueron (1) caracterizar el perfil de PK en suero de la monoterapia con v10000 y (2) explorar los posibles efectos antitumorales de v10000 en MTD, OBD o RD en pacientes elegibles con cánceres localmente avanzados (no extirpables) y/o metastásicos con expresión de HER2 seleccionados.

Pacientes

En el ensayo se incluyeron pacientes hombres y mujeres de ≥ 18 años de edad con un estado funcional de ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) de 0 o 1 y una expectativa de vida de al menos 3 meses según la opinión del investigador clínico.

En la parte 1, las cohortes 1-3 incluyeron pacientes con cualquier cáncer localmente avanzado (no extirpable) y/o metastásico con expresión de HER2 (HER2 1+, 2+, o 3+ mediante IHC) (que incluye, de modo no taxativo, cáncer de mama, gástrico, de ovarios, colorrectal y pulmonar no microcítico) que no habían evolucionado después de recibir todas las terapias que se sabe que

confieren beneficio clínico. Las cohortes 4-6 incluyeron pacientes con adenocarcinoma gastroesofágico (GEA) o cáncer de mama HER2 IHC 2+ /FISH-; pacientes con GEA o cáncer de mama HER2 IHC 3+ o HER2 IHC 2+ /FISH+. Las cohortes 4-6 también incluyeron pacientes con cualquier otro cáncer HER2 IHC 3+ o FISH+, donde el cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 (3+ mediante IHC) o HER2-2+ y FISH+ debía haber evolucionado después del tratamiento previo con trastuzumab, pertuzumab, y T-DM1; donde el GEA con sobreexpresión de HER2 (3+ mediante IHC) o HER2-2+ y FISH+ GEA debía haber evolucionado después del tratamiento previo con trastuzumab; donde los pacientes con cáncer colorrectal eran de tipo salvaje KRAS; o donde los pacientes con NSCLC eran de tipo salvaje ALK, tipo salvaje EGFR y negativos para la fusión de ROS1, según lo determinado mediante métodos estándar. La cohorte 7 se inscribió en centros seleccionados e incluyó pacientes con cáncer de mama HER2 IHC 3+, HER2 IHC 2+ /FISH+, o HER2 IHC 2+ /FISH-.

En la parte 2, la expansión de la cohorte mediante el uso de v10000 administrado en MTD, OBD o RD a partir de la parte 1 del estudio incluyó cáncer localmente avanzado (no extirpable) y/o metastásico que había evolucionado después de recibir todas las terapias que se sabe que confieren beneficio clínico (a menos que no fueran elegibles para recibir una terapia específica) de la siguiente manera:

Cohorte 1: cáncer de mama HER2 IHC 2+/FISH-

Cohorte 2: cáncer de mama HER2 IHC 3+ o HER2 IHC 2+/FISH+

Cohorte 3: GEA HER2 IHC 2+/FISH-

Cohorte 4: GEA HER2 IHC 3+ o HER2 IHC 2+/FISH+

Cohorte 5: Cualquier otro cáncer HER2 IHC 3+ o IHC 2+/FISH+, que incluye los siguientes:

Cohorte 5a: cánceres GI (gastrointestinales) HER2 IHC 3+ o IHC 2+/FISH+ distintos a GEA donde los pacientes con cáncer colorrectal eran de tipo salvaje KRAS

Cohorte 5b: Cualquier otro tipo de tumor sólido HER2 IHC 3+ o IHC 2+/FISH+ que no sea cáncer de mama o GI, donde los pacientes con NSCLC deben ser tipo salvaje ALK, tipo salvaje EGFR, y negativos para la fusión de ROS1, según lo determinado mediante métodos estándar. Los pacientes con cáncer de ovario deben ser de tipo salvaje KRAS.

Los criterios adicionales para los pacientes de las partes 1 y 2 incluyeron: (1) El cáncer de mama HER2 IHC 3+ o IHC 2+/FISH+ debe haber evolucionado después del tratamiento previo con trastuzumab, pertuzumab, y T-DM1; (2) El GEA HER2 IHC 3+ o IHC 2+/FISH+ GEA debe haber evolucionado después del tratamiento previo con trastuzumab; (3) Los pacientes con cáncer colorrectal deben ser de tipo salvaje del sarcoma de rata de Kirsten (KRAS); y (4) Los pacientes con NSCLC deben tener el tipo salvaje de cinasa de linfoma anaplásico (ALK), tipo salvaje de EGFR, y negativos para la fusión del receptor tirosina cinasa (ROS1), según lo determinado mediante métodos estándar.

Los pacientes se excluyeron del estudio si pueden aplicar 1 o más de los siguientes criterios:

1. Tratamiento con terapias experimentales dentro de las 4 semanas previas a la primera dosificación de v10000
2. Tratamiento con otra terapia contra el cáncer no especificada de otro modo dentro de las 4 semanas previas a la dosificación de v10000
- 5 3. Tratamiento con antraciclinas dentro de los 90 días previos a la primera dosificación de v10000 o una dosis total durante la vida superior a 300 mg/m² de adriamicina o equivalente
4. Tratamiento con trastuzumab, pertuzumab, lapatinib, o T-DM1 dentro de las 3 semanas previas a la primera dosificación de v10000
- 10 5. Metástasis cerebrales no tratadas (los pacientes con metástasis cerebrales tratadas que no consumen esteroides y se encuentran estables durante al menos 1 meses al momento de la Detección son elegibles). Todos los pacientes con cáncer de mama deben someterse a análisis de detección antes de iniciar el tratamiento. Aquellos pacientes que se encuentre que tienen metástasis cerebrales no tratadas pueden someterse nuevamente a detección después de la terapia adecuada.
- 15 6. Enfermedad leptomeníngea (LMD) evaluada clínicamente. Si la LMD se ha informado radiográficamente en la MRI inicial, pero no se sospecha clínicamente por el investigador, el paciente es elegible si no tiene síntomas neurológicos de LMD, según lo documente el investigador
- 20 7. Cirugía mayor o radioterapia dentro de las 3 semanas previas a la primera dosificación de v10000
8. Mujeres durante el embarazo y la lactancia
9. Antecedentes de hipersensibilidad potencialmente mortal a anticuerpos monoclonales o a proteínas recombinantes o excipientes en la formulación del fármaco
- 25 10. Cualquier otro cáncer dentro de los 3 años previos a la primera dosificación de v10000 con la excepción del cáncer de mama contralateral, carcinoma de cuello uterino *in situ* tratado de forma adecuada, o carcinoma de células escamosas o basal de la piel tratado de forma adecuada, o cualquier otro cáncer que se ha sometido a tratamiento curativo, con la aprobación del monitor médico del patrocinador.
- 30 11. Enfermedad renal aguda o crónica no controlada, pancreatitis o enfermedad hepática (con excepción de pacientes con síndrome de Gilbert, cálculos biliares asintomáticos, metástasis hepáticas o enfermedad hepática crónica estable, según la evaluación del investigador)
12. Neuropatía periférica: >Grado 2 según NCI-CTCAE versión 4.03, 14 de julio de 2010
13. Enfermedad pulmonar intersticial clínicamente significativa
- 35 14. Antecedentes de incumplimiento de los regímenes médicos
15. Falta de voluntad o capacidad para cumplir con el protocolo
16. Hepatitis B o C activa conocida o infección conocida con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

17. Uso de corticosteroides administrados en dosis equivalentes a > 15 mg por día de prednisona dentro de las 2 semanas de la primera dosificación de v10000, a menos que el monitor médico del estudio apruebe lo contrario.

18. QTc Fridericia (QTcF) > 450 ms.

5 19. Cualquier toxicidad relacionada con terapias contra el cáncer previas que no se hayan resuelto a $\leq$ Grado 1, con las siguientes excepciones: alopecia; neuropatía (que debe haberse resuelto a $\leq$ Grado 2); e insuficiencia cardíaca congestiva (CHF), cuya gravedad debe haber sido $\leq$ Grado 1 cuando ocurrió, y debe haberse resuelto por completo.

10 20. Enfermedad cardíaca clínicamente significativa tal como arritmia ventricular que requiere terapia, hipertensión no controlada o cualquier antecedente de CHF sintomática.

21. Infarto al miocardio o angina inestable conocidos dentro de los 6 meses previos a la primera dosificación de v10000.

Tratamiento

15 v10000 como agente único (monoterapia) se administró por vía intravenosa (IV) en las partes 1 y 2. v10000 se administró mediante infusión IV en solución salina normal al 0.9 % durante 120 a 150 minutos. Si para un paciente en particular las primeras 2 dosis administradas fueron bien toleradas, la duración de la infusión para ese paciente puede haber disminuido a 90 minutos. Si las siguientes 2 dosis son bien toleradas, la duración de la infusión puede disminuir a 60 minutos. La velocidad de infusión no supera los 250 mL de solución salina normal al 0.9 %/hora. (Ejemplo:

20 Si una dosis de v10000 se diluye en una bolsa de solución salina de 250 mL, la infusión debería administrarse durante al menos 60 minutos. Si una dosis de v10000 se diluyó en una bolsa de 500 mL, la infusión debe administrarse durante al menos 120 minutos). La dosificación del fármaco del estudio se calculó en base al peso del paciente el día 1 del ciclo 1. La dosis se volvió a calcular solo si hubo un cambio en el peso de 10 % desde la evaluación del día 1 del ciclo 1.

25 En la parte 1, los niveles de dosis para el aumento de la dosis fueron de 5, 10 y 15 mg/kg administrados una vez a la semana (QW). También se evaluó la dosificación bisemanal (Q2W). Los niveles de dosis para Q2W fueron 20, 25 o 30 mg/kg. La dosificación Q2W puede haber utilizado una dosis de carga inicial (no superior a 20, 25 o 30 mg/kg) seguido de la administración

30 de v10000 en un nivel de dosis inferior, según lo recomendado por el SMC. Adicionalmente, se estudió la dosificación con 30 mg/kg cada 3 semanas (Q3W).

El nivel de dosis para la parte 2 fue la MTD, OBD o una RD según lo determinado en la parte 1. La MTD se define como el nivel de dosis más alto al que no más de 1 de 6 pacientes experimentaron DLT durante las primeras 4 semanas de tratamiento. La OBD se define como la

35 dosis de v10000 que da como resultado una concentración en suero de v10000 mínima (7 días después de la dosis) que es al menos 10 veces superior a la capacidad de unión máxima de v10000 en una línea celular que representa la histología tumoral de HER2-3+. Una RD es cualquier otra dosis que no supere la MTD. En base a los resultados de la parte 1, se usó la RD

de 20 mg/kg Q2W para tratar a la mayoría de los pacientes en la parte 2. Algunos pacientes se trataron con 10 mg/kg semanales.

Los pacientes participaron durante un mínimo de 2 ciclos de 3 o 4 semanas cada uno dependiendo de la parte, cohorte o TG en la que se inscribió el paciente. El tratamiento puede haber continuado durante ciclos adicionales, siempre que no hubo evidencia de evolución clínica, toxicidad inaceptable o evidencia de enfermedad progresiva según lo definido por RECIST versión 1.1. La evolución clínica se define como un empeoramiento o reaparición de los síntomas preexistentes relacionados con los cánceres subyacentes, o aparición de nuevos síntomas que no pueden atribuirse a las toxicidades de los fármacos del estudio o causas alternativas. Los pacientes que en opinión del investigador clínico hayan demostrado un beneficio clínico continuo a pesar de la evolución radiológica pueden haber continuado recibiendo el tratamiento tras la discusión con el monitor médico del patrocinador y su aprobación. Para la parte 3, los pacientes pueden haber continuado recibiendo el tratamiento con v10000 si se interrumpió la quimioterapia debido a toxicidad no relacionada con v10000. Los pacientes que interrumpieron el tratamiento con v10000 por cualquier motivo fueron retirados del estudio.

Evaluaciones de eficacia

Se evaluaron medidas de actividad antitumoral en función de las evaluaciones de respuesta realizadas de acuerdo con el uso de los nuevos criterios internacionales propuestos por las pautas revisadas de criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) (versión 1.1) [Eur J Ca 45:228-247, 2009]. Los cambios en el diámetro más grande (medida unidimensional) de las lesiones tumorales y el diámetro más corto en el caso de los ganglios linfáticos malignos se usan en los criterios de RECIST versión 1.1. El investigador determinó la respuesta clínica de CR, PR, SD o enfermedad progresiva (PD) en cada evaluación. La PD incluyó la enfermedad progresiva según RECIST versión 1.1 y la evolución clínica de la enfermedad según el investigador. La evolución clínica se define como un empeoramiento o reaparición de los síntomas preexistentes relacionados con los cánceres subyacentes, o aparición de nuevos síntomas que no pueden atribuirse a las toxicidades de los fármacos del estudio o causas alternativas.

La tasa de respuesta objetiva (ORR) se define como el porcentaje de pacientes que tienen al menos 1 respuesta tumoral general de CR o PR antes de cualquier evidencia de evolución, según lo definido por RECIST versión 1.1. Se dice que un paciente ha logrado el control de la enfermedad si tiene una respuesta tumoral de CR, PR o SD de acuerdo con los criterios de RECIST versión 1.1. La tasa de control de la enfermedad se evaluará cada 8 semanas después del inicio de la terapia con v10000. El tiempo de PFS se define como el tiempo desde la primera dosis de v10000 hasta la fecha de evolución de la enfermedad documentada según RECIST versión 1.1, la evolución clínica o la muerte por cualquier causa. Los pacientes que están vivos y no han evolucionado al momento del análisis serán censurados en el momento de su última

evaluación tumoral si tuvieron una CR, PR o SD.

Las respuestas tumorales se evaluaron en función de exploraciones mediante CT y/o MRI (mediante el uso de la misma metodología para cada exploración del mismo paciente) del tórax, el abdomen y la pelvis y áreas adicionales de compromiso tumoral conocido o sospechado (por ejemplo, cerebro, extremidades).

Las respuestas objetivas y la evolución tumoral se evaluaron localmente. Se recopilaron exploraciones para todos los sujetos para una revisión centralizada realizada según el criterio del patrocinador. Se usaron evaluaciones locales para todas las decisiones relacionadas con el tratamiento.

Para algunos pacientes, el volumen tumoral puede calcularse centralmente.

Efectos adversos

Un AE (efecto adverso) se define como cualquier evento médico inadecuado en un paciente del estudio clínico al que se le administra un producto medicinal que no necesariamente tiene una relación causal con este tratamiento. Por lo tanto, un AE podría ser cualquier signo desfavorable y no planeado (lo que incluye hallazgos de laboratorio anormales), síntoma o enfermedad temporalmente asociada al uso del producto medicinal (en investigación), ya sea que esté relacionado o no con el producto medicinal (en investigación). Esto incluye una exacerbación de eventos o condiciones preexistentes, enfermedades intercurrentes, interacción farmacológica o el empeoramiento significativo de la indicación en investigación que no se registra en otra parte en el CRF bajo evaluaciones específicas de eficacia. Las evaluaciones de seguridad se realizaron en base a NCI-CTCAE versión 4.03, 14 de julio de 2010.

Resultados iniciales:

En junio de 2018, en un paciente con cáncer de vesícula biliar, el tratamiento con v10000 produjo una disminución aproximada de 40 % en la suma de los diámetros más largos (SLD) en las lesiones diana. Posteriormente, este paciente presentó una disminución aproximada de 50 % en las lesiones diana, según se midió mediante SOD (suma de los diámetros).

En noviembre de 2018, en un paciente con CCA, se observó una disminución de aproximadamente 40 % en las lesiones diana después del tratamiento con v10000, según se midió mediante SOD.

Resultados provisionales:

El 22 de abril de 2019, 89 pacientes de todas las indicaciones habían sido inscritos y tratados con un único agente v10000 en las partes 1 y 2 de v10000 (23 en la parte 1 y 66 en la parte 2) (Tabla C). Los tipos de tumores evaluados incluyeron cáncer de mama (n=42), gastroesofágico (n=20), colorrectal (n=11), vías biliares (n=6), y otros cánceres (n=10). Entre los pacientes con BTC, la mediana de la cantidad de regímenes sistémicos previos recibidos fue de 4 (intervalo de 1-8), incluido trastuzumab en un paciente.

En las partes 1 y 2 del estudio, la mayoría de los AE tuvieron una gravedad de Grado 1 o 2 (Tabla D). Los AE de Grado 3 relacionados con v10000 incluyeron fatiga (n=3, incluido un evento informado como un SAE), diarrea (n=2), artralgia (n=1), e hipofosfatemia (n=1).

Los datos preliminares de eficacia para los pacientes con BTC se presentan en la Tabla E, Tabla F y Figura 2.

Tabla C. Características iniciales y demográficas clave por tipo de cáncer en las partes 1 y 2

Característica		BTC (n=6)	Todos los cánceres (n=89)
Edad	Mediana (intervalo)	64.5 (47-74)	60 (27-81)
Sexo	Femenino, n (%)	3 (50)	58 (65)
	Masculino, n (%)	3 (50)	31 (35)
Raza	Blanca, n (%)	2 (33)	63 (71)
	Asiática	3 (50)	14 (16)
	Otros	1 (17)	12 (13)

Tabla D. Resumen de eventos adversos relacionados con v10000 por tipo de cáncer en las partes 1 y 2

	AE relacionados con v10000	BTC (%) (n=6)	Todos los cánceres (%) (n=89)
Cualquiera		5 (83)	70 (79)
Más común (> 20 %)	Diarrea	3 (50)	39 (44)
	Reacción relacionada con la infusión	2 (33)	28 (31)

Tabla E. Resumen de la mejor respuesta en el conjunto de análisis de enfermedades medibles en las partes 1 y 2

	DCR (PR+SD) ^a		ORR ^a		PFS (meses) ^b		
Tipo de cáncer	n/N (%)	IC de 95 %	n/N (%)	IC de 95 %	Censurado n/N (%)	Mediana	IC de 95 %
BTC	5/6 (83.3)	35.9, 99.6	4/6 (66.7)	22.3, 95.7	4/6	NE	1.8, NE
Todos los	48/67	59.3,	22/67	21.8,	32/89	3.7	2.2, 5.2

cánceres	(71.7)	82.0	(32.8)	45.4			
----------	--------	------	--------	------	--	--	--

^a Conjunto de análisis de enfermedades medibles – todos los pacientes en el conjunto de análisis de seguridad con enfermedad medible según RECIST 1.1;

^b Conjunto de análisis de seguridad – todos los pacientes que recibieron al menos una dosis del tratamiento del estudio.

IC = intervalo de confianza, DCR = tasa de control de la enfermedad, NE = no puede evaluarse, ORR = tasa de respuesta general, PFS = supervivencia libre de evolución, PR = respuesta parcial, SD = enfermedad estable

Tabla F. Regímenes previos y respuesta de la enfermedad para pacientes con BTC

Paciente #	N regímenes sistémicos previos/HER2 previo	Mejor respuesta a v10000	Duración de la respuesta (mos)	Tiempo en el estudio (mos)	Estado en el estudio
1003-220 (GBC)	8/6 ^b	cPR	11.0 ^c	13.3	Activo
1003-242 (CC)	1/0	cPR	3.2 ^c	5.1	No activo, PD
1003-265 (GBC)	1/0	PD	NA	2.3	No activo, PD
1003-275 (GBC)	3/0	cPR	3.5 ^c	6.0	Activo
3004-294 (CC)	4/0	SD	NA	2.3	Activo
3004-297 (CC)	7/0	PR	NE ^c	2.3	Activo

^a Todos los pacientes con BTC eran HER2+ (3+ o FISH+);

^b Los pacientes recibieron trastuzumab junto con 6 de sus 8 regímenes sistémicos;

^c La DOR final con evaluación adicional de la enfermedad pendiente.

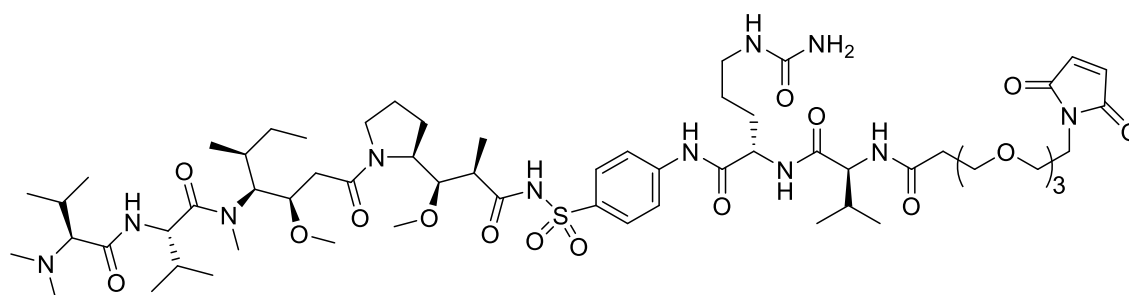
NA = no aplicable NE = no puede evaluarse, evaluación de seguimiento de la enfermedad pendiente

GBC=cáncer de vesícula biliar; CC=colangiocarcinoma

Estos datos indican que v10000 demostró una tasa de control de la enfermedad en pacientes con BTC HER2 3+ o FISH+ de 83.3 %, y una ORR de 66.7 %.

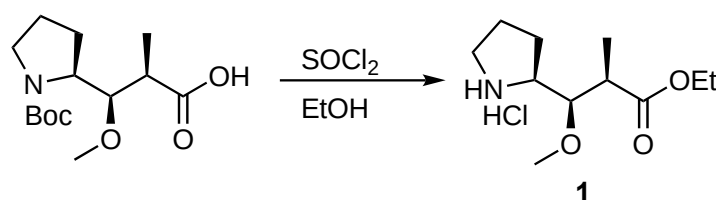
Ejemplo 3: Preparación de la toxina enlazadora 001

La toxina enlazadora 001 se preparó tal como se describe a continuación. La toxina enlazadora 001 también puede prepararse tal como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2016/041082.



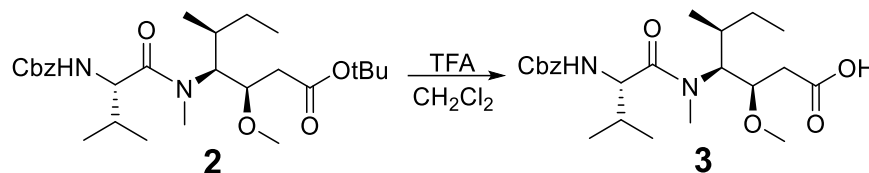
Toxina enlazadora 001

A. (2R,3R)-3-metoxi-2-metil-3-((S)-pirrolidin-2-il)propanoato de etilo (Compuesto 1)



A una solución agitada de ácido (2R,3R)-3-((S)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico (Boc-Dap-OH, 4.31 g, 15.0 mmol) en etanol absoluto (27.0 mL) a 0 °C se le agregó cloruro de tionilo (3.0 mL) por goteo. Se dejó que la solución resultante se calentara hasta temperatura ambiente y se monitoreó su evolución mediante HPLC-MS. Después de 18 h, no se detectó material de partida restante y la solución se concentró hasta sequedad a presión reducida. El aceite resultante se suspendió en tolueno (10 mL) y se concentró a presión reducida dos veces, luego, se suspendió en éter dietílico (5 mL) y se concentró a presión reducida dos veces para obtener una espuma sólida blanca (3.78 g, % de rendimiento cuantitativo). MS *m/z* obs. = 216.5 (M+1).

B. ácido (3R,4S,5S)-4-((S)-2-(((benciloxi)carbonil)amino)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoico (Compuesto 3)

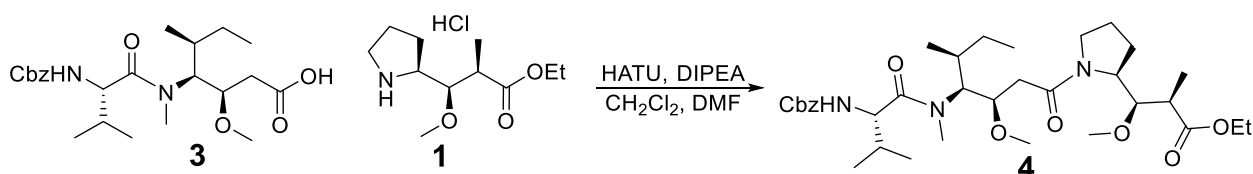


El Compuesto **2** se preparó tal como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2016/041082.

A una solución agitada del Compuesto **2** (6.965 g, 14.14 mmol) en diclorometano (20 mL) se le agregó ácido trifluoroacético (5.0 mL). La reacción se monitoreó hasta que se completó mediante HPLC-MS y después de 40 h, no quedaba material de partida. La reacción se concentró a presión reducida, se evaporó junto con tolueno (2 x 10 mL) y diclorometano (2 x 10 mL) para obtener un sólido blanco espumoso (6.2 g, rendimiento cuantitativo con TFA residual). Este material se

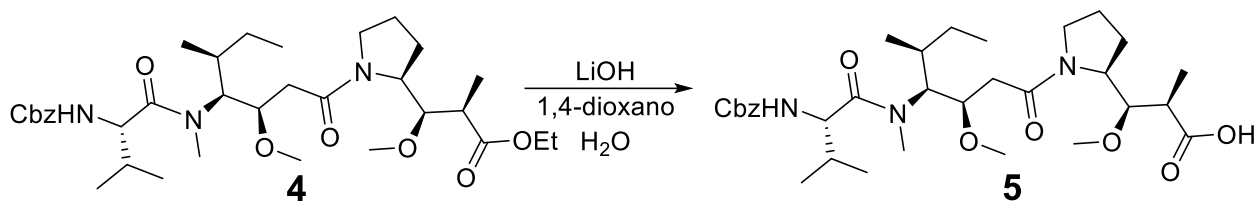
disolvió en 200 mL de EtOAc:hexanos 1:3 caliente y se permitió que se enfriara hasta temperatura ambiente. Durante el enfriamiento, se formó un precipitado, así como cristales pequeños. Se agregó 5 mL de EtOAc y la suspensión se calentó una vez más para disolver completamente el precipitado. Se formaron más cristales durante el enfriamiento a temperatura ambiente y el matraz se colocó a -30 °C durante la noche. La mañana siguiente, se decantó el licor madre y los cristales se enjuagaron con 2 x 50 mL de hexanos y se secaron con alto vacío. Se recuperaron 5.67 g de producto cristalino. MS m/z obs. = 405.7 (M+1).

C. (2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-(((benciloxi)carbonil)amino)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoato de etilo (Compuesto 4)



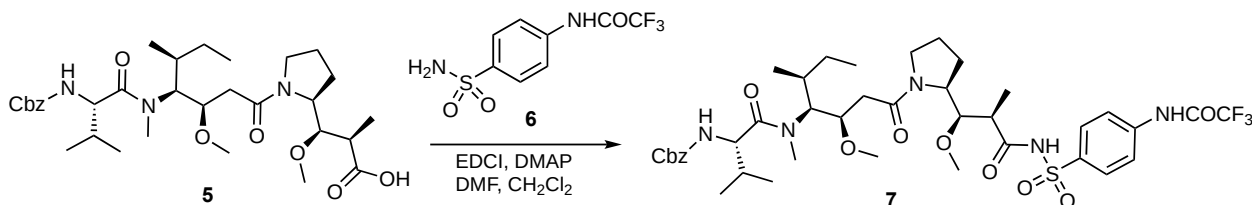
A una solución agitada del Compuesto **3** (6.711 g, 15.37 mmol, 1.025 equiv) en una mezcla de diclorometano (5.0 mL) y *N,N*-dimetilformamida (5.0 mL) a temperatura ambiente se la agregó HATU (5.732 g, 15.07 mmol, 1.005 equiv) y *N,N*-diisopropiletilamina (7.84 mL, 3 equiv). Después de agitarse durante 30 minutos a temperatura ambiente, se agregó una solución del Compuesto **1** (3.776 g, 15.00 mmol, 1.0 equiv) en una mezcla de diclorometano (1.0 mL) y *N,N*-dimetilformamida (1.0 mL) por goteo, se enjuagó en el Compuesto **1** residual con 3 mL adicionales de diclorometano:*N,N*-dimetilformamida 1:1. La reacción se monitoreó mediante HPLC-MS y no se observó Compuesto **1** restante después de 15 minutos. La reacción se concentró a presión reducida, se diluyó con acetato de etilo (~125 mL) y la fase orgánica se extrajo con HCl 1 M (2 x 50 mL), 1 x dH₂O (1 x 50 mL), NaHCO₃ saturado (3 x 50 mL), salmuera (25 mL). Las capas ácida y básica se lavaron con 25 mL de EtOAc. Todos los productos orgánicos se agruparon luego y se secaron con MgSO₄, se filtraron y se concentraron para proporcionar un aceite rojo. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano (~10 mL), se cargó en una columna de gel de sílice Biotage® SNAP Ultra de 360 g (sistema ultrarrápido Isolera™; Biotage AB, Suecia) para la purificación (20-100 % EtOAc en hexanos en 10 volúmenes de columna). Las fracciones que contenían producto puro se agruparon para recuperar 7.9 g de sólido blanco espumoso. Las fracciones impuras se sometieron a una segunda purificación en una columna de gel de sílice Biotage® SNAP Ultra de 100 g y se agruparon con producto puro para recuperar un sólido espumoso blanco (8.390 g, 88.3 %). MS m/z obs. = 634.7 (M+1).

D. Ácido (2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-(((benciloxi)carbonil)amino)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico (Compuesto 5)



A una solución agitada del Compuesto **4** (8.390 g, 13.24 mmol) en 1,4-dioxano (158 mL) se le agregó dH₂O (39.7 ml) y monohidrato de hidróxido de litio (1 M en H₂O, 39.7 mL, 3 equiv). La reacción se agitó a 4 °C y se monitoreó mediante HPLC-MS para determinar el consumo del material de partida, que tomó 3 días para que solo permanecieran trazas del Compuesto **4**. Durante el transcurso de la reacción, se formó un nuevo producto, correspondiente a la pérdida de metanol (β -eliminación, < 2 %) en porcentajes pequeños además del material deseado. La reacción se acidificó con la adición de HCl acuoso 1 M (50 mL) y se concentró a presión reducida para retirar el dioxano. La mezcla de reacción restante se extrajo con acetato de etilo (4 x 50 mL) y la fase orgánica se agrupó, se lavó con salmuera (15 mL + 2 mL HCl 2 M), se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para producir un aceite de color claro. El aceite se redisolvió en éter dietílico (~50 mL) y se concentró a presión reducida (3x) para facilitar la remoción de dioxano residual, obteniendo el producto del título como un aceite rígido (7.81 g 97 % de rendimiento con algo de dioxano residual y el Compuesto **4**). MS *m/z* obs. = 606.7 (M+1).

E. *((S)-1-(((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-((4-(2,2,2-trifluoroacetamido)fenil)sulfonamido)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de bencilo (Compuesto 7)*

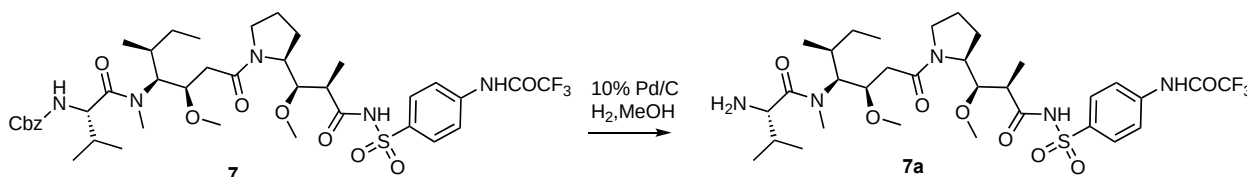


El Compuesto **6** se preparó tal como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2016/041082.

A una solución agitada del Compuesto **5** (7.12 g, 11.754 mmol) en diclorometano (20 mL) se le agregó 2,2,2-trifluoro-*N*-(4-sulfamoylphenil)acetamida (Compuesto **6**, 4.095 g, 1.3 equiv, disuelto en 3 mL de DMF), *N,N*-dimetilpiridina (1.867 g, 1.3 equiv) y *N,N*-dimetilformamida (1.5 mL) para generar una suspensión amarilla clara. La adición de otros 5 mL de DMF no aclaró la solución. Se agregó clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDCI) (2.817 g, 1.25 equiv) en una sola parte y la reacción se monitoreó mediante HPLC-MS. Después de 48 h, la reacción no evolucionó más y se agregaron 400 mg adicionales de EDCI. Después de 18 h, no se observó material de partida restante y la reacción se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite amarillo. El aceite se disolvió en acetato de etilo (~150 mL) y HCl 1 M (20 mL), y la fase orgánica se lavó con HCl 2 M frío (2 x 10 mL), NaHCO₃ saturado (1 x 10 mL),

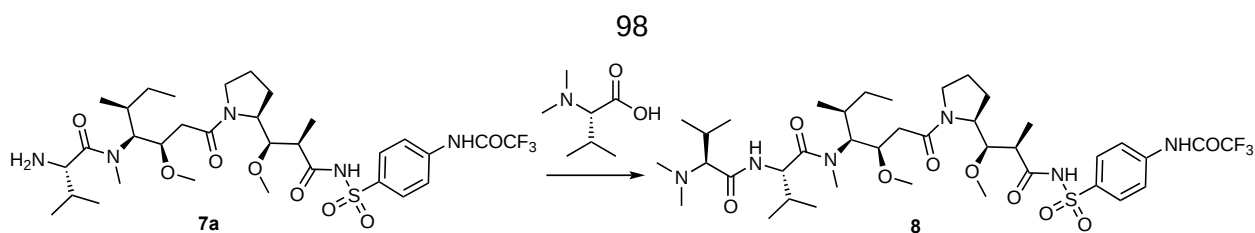
salmuera (20 mL + 5 mL de HCl 2 M). Las fracciones acuosas ácida y básica se extrajeron con EtOAc (1 x 20 mL), todas las fracciones orgánicas se agruparon, se secaron con MgSO₄ y se concentraron a presión reducida para producir un sólido bruto oleoso (13 g). El residuo se disolvió en diclorometano (~10 mL), se cargó en una columna de gel de sílice Biotage® SNAP Ultra de 360 g y se purificó con un gradiente de EtOAc al 10-100 % (AcOH al 2 %) en hexanos en 12 volúmenes de columna con una meseta de a 3 volúmenes de columna con EtOAc al 50 %. Las fracciones que contenían producto puro se agruparon, se concentraron a presión reducida, se disolvieron y se concentraron a partir de tolueno (2 x 10 mL) y éter etílico (2 x 10 mL) para obtener el producto deseado, 7.1 g de sólido espumoso blanco. Las fracciones impuras se sometieron a purificación repetida en condiciones de gradiente menos profundo mediante el uso de una columna de gel de sílice Biotage® SNAP Ultra de 100 g en un instrumento Isolera™. Se agruparon todas las fracciones puras para recuperar el producto puro como un sólido espumoso blanco (8.60 g, 86 %). MS *m/z* obs. = 856.7 (M+1).

F. (S)-2-amino-N-((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-((4-(2,2,2-trifluoroacetamido)fenil)sulfonamido)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetilbutanamida (Compuesto 7a)



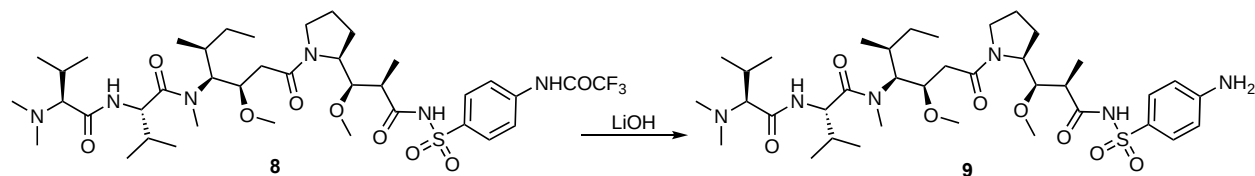
El Compuesto 7 (3.71 g, 4.33 mmol) se disolvió en *N,N*-dimetilformamida al 10 % en acetato de etilo (30 mL) en un matraz de fondo redondo que contenía un agitador magnético y se ajustó con un adaptador de línea de gas de 3 vías. El recipiente se evacuó dos veces a presión reducida y se cargó con gas nitrógeno. Se agregó paladio en carbono al 10 % (0.461 g, 0.1 equiv) en una sola parte, el adaptador de 3 vías se ajustó al matraz, se ajustó un globo de hidrógeno al adaptador y el recipiente se evacuó dos veces a presión reducida y se cargó con hidrógeno. Se permitió que la reacción se agitara durante 2 días, y durante este tiempo se recargó ocasionalmente el globo de hidrógeno. Después de aproximadamente 48 h, el análisis de HPLC-MS indicó que no permaneció nada del material de partida. La mezcla de reacción se diluyó con metanol (20 mL) y se filtró a través de un tapón de celite. El celite se lavó con metanol (2 x 50 mL). Se agruparon todos los filtrados y se concentraron a presión reducida y el aceite resultante se disolvió y se concentró a partir de diclorometano. Después de secarse a presión reducida, el compuesto del título se aisló como un polvo incoloro (3.10 g, 99 %). MS *m/z* obs. = 722.6 (M+1).

G. (S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-N-((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-((4-(2,2,2-trifluoroacetamido)fenil)sulfonamido) propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetilbutanamida (Compuesto 8)



A una solución agitada de *N,N*-(*L*)-dimetilvalina (1.696 g, 9.35 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (10 mL) se le agregó HATU (3.216 g, 8.46 mmol) y di-isopropiletilamina (3.10 mL, 17.8 mmol). Se produjo una solución amarilla transparente después de 5 minutos. La agitación continuó durante 10 minutos adicionales, luego, se agregó el Compuesto **7a** (3.213 g, 4.45 mmol) en una sola parte. Después de 1 h de agitación adicional, HPLC-MS indicó que aún quedaban cantidades de trazas del Compuesto **7a** y la reacción se produjo durante 16 h. Luego, la reacción se concentró a presión reducida, se diluyó con acetato de etilo (120 mL) y 40 mL 1:1 de NaHCO₃ (sat.): LiCl al 5 % y se transfirió a un embudo de separación. La capa acuosa se retiró y la capa orgánica se lavó con LiCl (1 x 20 mL), NaHCO₃ (sat., 2 x 20 mL). Las capas acuosas se agruparon y se extrajeron con EtOAc (3 x 50 mL). Las capas orgánicas se agruparon y se lavaron con salmuera (1 x 20 mL), se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para proporcionar un aceite cargado de DMF que se concentró en evaporador giratorio para retirar el DMF residual, lo que produjo 7 g de aceite bruto de color amarillento. El aceite se disolvió en una cantidad mínima de metanol al 10 % en diclorometano (~11 mL) y se cargó en una columna de gel de sílice Biotage® SNAP Ultra de 360 g para la purificación (MeOH 2-20 % en CH₂Cl₂ en 15 volúmenes de columna, el producto eluyó a alrededor de 10-13 %). Las fracciones que contenían el producto deseado se agruparon y se concentraron a presión reducida para obtener el compuesto del título como una espuma incolora. Las fracciones impuras se combinaron, se evaporaron y se sometieron a purificación repetida en una columna de gel de sílice Biotage® SNAP Ultra de 100 g en un instrumento Isolera™ y se combinaron con el producto bruto de la primera columna para producir un sólido espumoso blanco (3.78 g). MS *m/z* obs. = 850.6 (*M*+1).

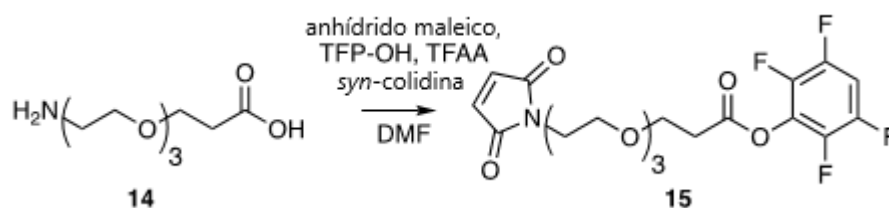
H. (S)-*N*-((3*R*,4*S*,5*R*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-((4-aminofenil)sulfonamido)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-2-((*S*)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-*N*,3-dimetilbutanamida (Compuesto 9)



A una solución agitada del Compuesto **8** (0.980 g, 1.154 mmol) en 1,4-dioxano (15 mL) se le agregó agua (3.5 mL) y monohidrato de hidróxido de litio 1 M (3 equiv., 3.46 mL). Se permitió que la suspensión ligera resultante se agitara a 4 °C y se monitoreó mediante HPLC-MS para determinar el consumo del material de partida. Cuando se completó la conversión (~5 días), la reacción se neutralizó con 3.46 mL de HCl 1 M y se concentró a presión reducida para retirar el dioxano. La fase acuosa resultante se diluyó con 60 mL de EtOAc y 5 mL de salmuera, luego, se

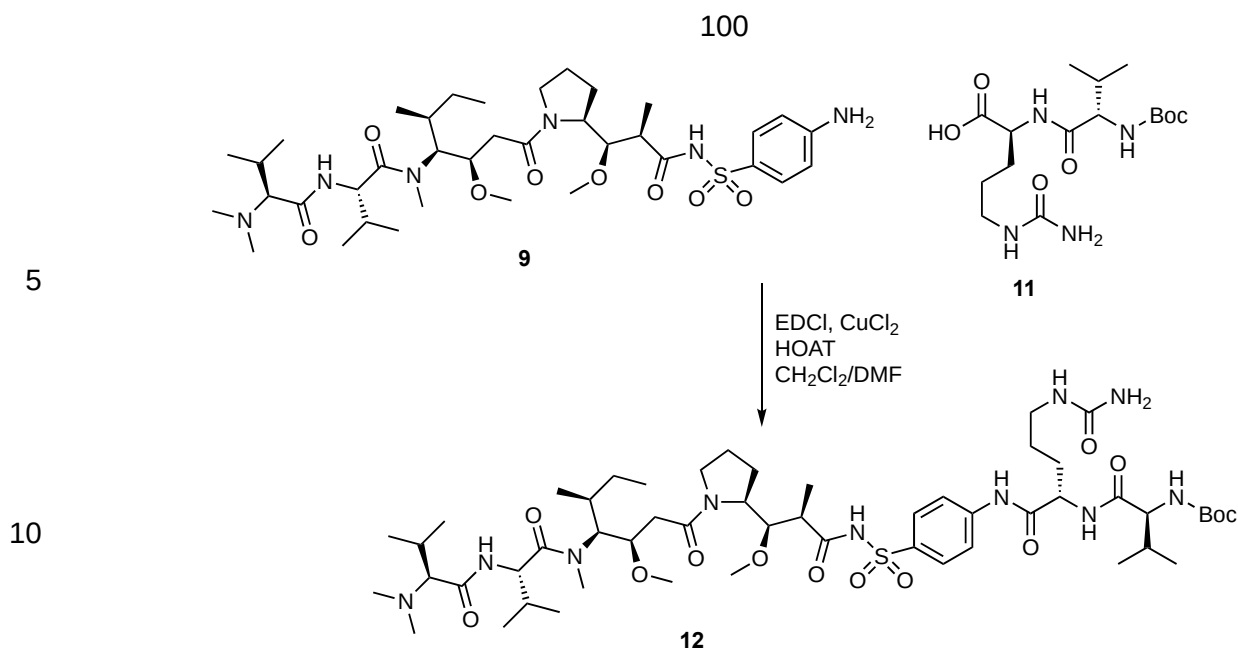
extrajo con acetato de etilo (2 x 30 mL). Las fracciones orgánicas se agruparon, se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron para producir el compuesto del título como un sólido tostado (0.930 g). R_f = 0.5 (MeOH 8 % en CH₂Cl₂). MS *m/z* obs. = 753.7 (M+1).

I. 3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)propanoato de 2,3,5,6-tetrafluorofenilo (Compuesto 15)



En un matraz cónico seco de 50 mL, se disolvió ácido 3-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)propanoico (Compuesto **14**, 1.000 g, 4.52 mmol) y anhídrido maleico (0.443 g, 4.52 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (5 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h con N₂, momento en el cual se enfrió hasta 0 °C y se agregó *syn*-colidina por goteo (1.263 mL, 2.1 eq). En un matraz cónico de 50 mL separado seco, se disolvió tetrafluorofenol (3.002 g, 4 eq) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (10 mL). El matraz se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo y se agregó anhídrido trifluoroacético (2.548 mL, 4 eq) por goteo. Este matraz se agitó durante 15 minutos, momento en el cual se agregó *syn*-colidina (2.407 mL, 4 eq) por goteo. Se permitió que el matraz se agitara durante otros 15 minutos, y luego, se agregó el contenido al matraz por goteo a través de una jeringa. Se permitió que la reacción se calentara hasta temperatura ambiente y la agitación continuó con N₂. La reacción se monitoreó mediante HPLC-MS para determinar el consumo del material de partida. Después de 6 días, la reacción se completó con el consumo total del Compuesto **14**, dejando solo el Compuesto **15** y una pequeña cantidad (~5 %) del intermedio de amida maleica bis-TFP. La reacción se transfirió a un embudo de separación, se diluyó con éter dietílico (75 mL) y se lavó con LiCl al 5 % (1 x 20 mL), HCl 1 M (2 x 20 mL), NaHCO₃ saturado (5 x 20 mL) y salmuera (1 x 20 mL). La capa orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar un aceite bruto marrón con DMF residual. El aceite bruto se disolvió en 8 mL de DMF:H₂O 1:1 + TFA al 0.1 %, se cargó en una columna C18 de 60 g Biotage® SNAP Ultra (Biotage AB, Uppsala, Suecia) y se purificó en un gradiente lineal 30-100 % de ACN/H₂O + TFA al 0.1 % en 8 volúmenes de columna. Las fracciones puras se agruparon y se diluyeron con salmuera (20 mL), luego, se extrajeron con 3 x 50 mL de Et₂O. Los productos orgánicos se secaron con MgSO₄, se filtraron y se evaporaron para recuperar un aceite amarillo claro (1.34 g, 66 % de rendimiento).

J. ((S)-1-(((S)-1-((4-(N-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)sulfamoil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de terc-butilo (Compuesto 12)

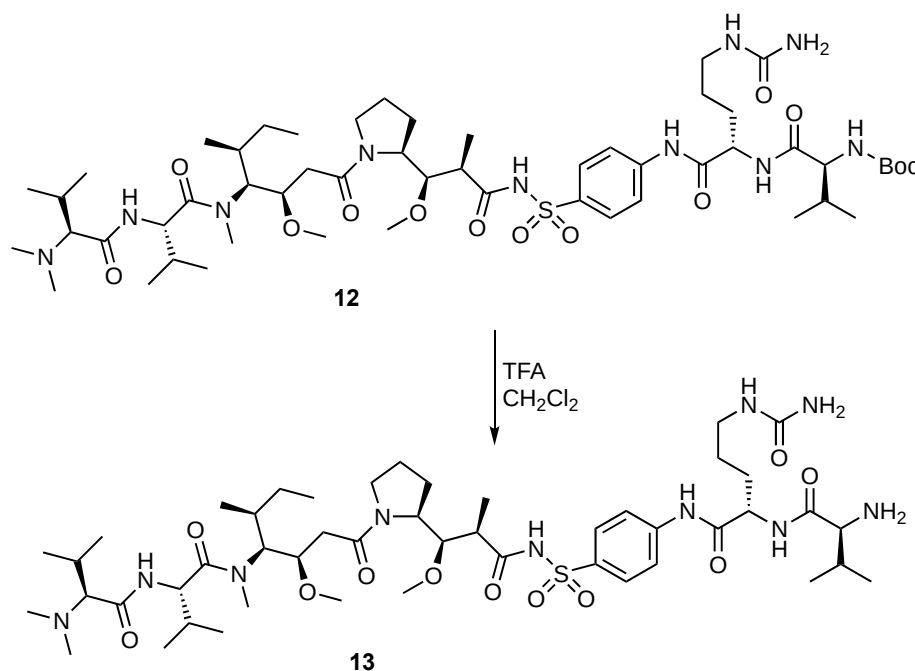


El Compuesto **11** se preparó tal como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2016/041082.

A un matraz vacío de 25 mL en forma de pera, se le agregó el Compuesto **11** (1.342 g, 3.58 mmol, 3.0 equiv), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0.664 g, 3.46 mmol, 2.9 equiv) y 7-hidroxi-azabenzotriazol (HOAT) (0.472g, 3.46 mmol, 2.9 equiv). Estos sólidos se disolvieron en una mezcla de *N,N*-dimetilformamida (0.5 mL) y diclorometano (4.5 mL) con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por separado, el Compuesto **9** (0.900 g, 1.20 mmol) se disolvió en una mezcla de *N,N*-dimetilformamida (0.2 mL) y diclorometano (1.8 mL) y se agregó al matraz en forma de pera, se enjuagó con diclorometano (1.0 mL). La velocidad de agitación se incrementó a 1000 rpm, lo que produjo un vórtice. Dentro de los 2 minutos de la adición del Compuesto **9**, se agregó cloruro de cobre (II) (0.514 g, 3.83 mmol, 3.2 equiv) en una parte directamente en el centro del vórtice a través de un embudo de polvo estrecho. La solución inicialmente de color amarillo claro se volvió una suspensión marrón oscuro que cambió durante 10 minutos a una suspensión verde oscura. La reacción se monitoreó hasta que se completó mediante HPLC-MS y no se observaron cambios en el progreso de la reacción entre las muestras tomadas a los 30 minutos y 1 h (~95 % completa). Se permitió que la reacción se agitara durante la noche a temperatura ambiente, luego, se agregó 2-(2-aminoetilamino)etanol (0.483 mL, 4.781 mmol, 4 equiv), EtOAc (10 mL) y dH₂O (5 mL) a la suspensión agitada, que experimentó un cambio de color a azul oscuro. La suspensión se agitó vigorosamente durante 4 h a medida que los sólidos suspendidos se disolvieron gradualmente en la mezcla bifásica. Esta mezcla se transfirió a un embudo de separación y se diluyó con EtOAc (100 mL) y salmuera (10 mL), y la capa acuosa se extrajo con IpOH/ EtOAc 10 % (4 x 50 mL). Las capas orgánicas se agruparon y se lavaron con salmuera (10 mL), se secaron con Na₂SO₄, y se evaporaron para producir un sólido bruto ligeramente azul. Este sólido bruto se disolvió en una mezcla de metanol (0.5 mL) y diclorometano (6 mL) y se purificó en una columna de gel de sílice Biotage® SNAP Ultra de 100

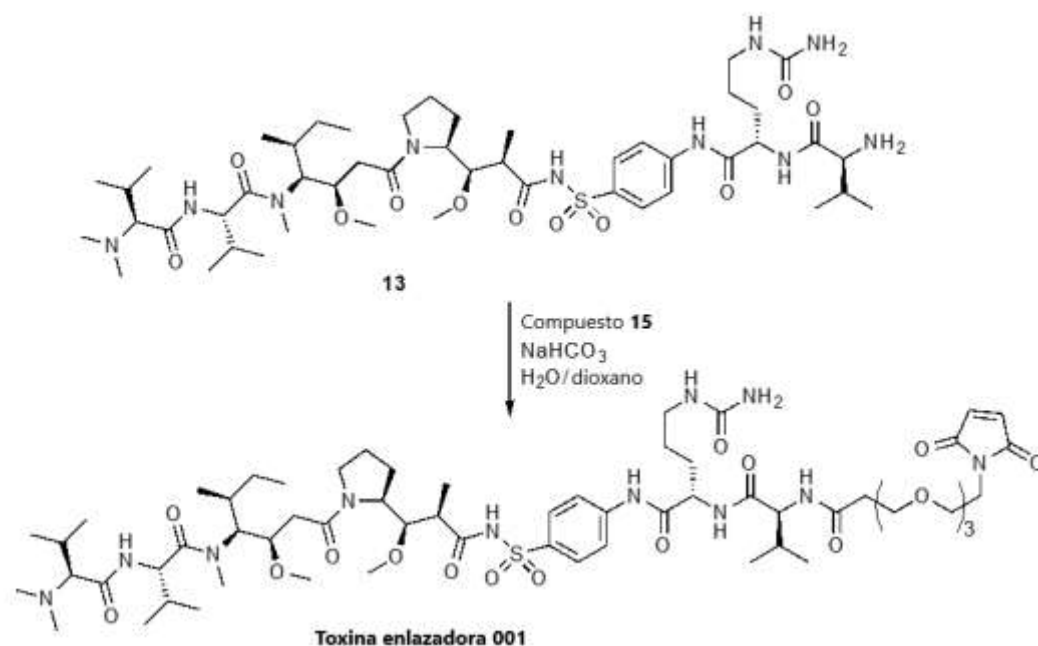
g (MeOH 2-20 % en CH₂Cl₂ en 10 volúmenes de columna, seguido por una meseta de 8 volúmenes de columna de MeOH 20 %). El producto se eluyó como un pico amplio después de 1-2 volúmenes de columna a MeOH ~20 % en CH₂Cl₂. Las fracciones que contenían el material deseado se agruparon y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (1.105 g, 83 %). MS *m/z* obs. = 555.9 ((M+2)/2), 1109.8 (M+1).

K. (S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-N-(4-(N-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5R)-4-((S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)sulfamoil)fenil)-5-ureidopentanamida (Compuesto 13)



A una solución del Compuesto **12** (0.926 g, 0.834mmol) se le agregó una mezcla de diclorometano (10 mL) y ácido (2.0 mL). La reacción se monitoreó mediante HPLC-MS para determinar el consumo del material de partida (~45 minutos). La reacción se evaporó conjuntamente con acetonitrilo (2 x 10 mL) y diclorometano (2 x 10 mL) a presión reducida para retirar el exceso de ácido trifluoroacético. El residuo resultante se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano y metanol (3:1, v/v, ~2 mL), y se agregó a la solución agitada de éter dietílico (200 mL) y hexanos (100 mL) por goteo a través de una pipeta, lo que produjo una suspensión de sólidos blancos ligeros. Los sólidos se filtraron y se secaron al vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un polvo blanco, como la sal de trifluoroacetato (1.04 g, rendimiento cuantitativo con algunos solventes residuales). MS *m/z* obs. = 505.8 ((M+2)/2).

L. (S)-N-(4-(N-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5R)-4-((S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)sulfamoil)fenil)-2-((S)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-14-isopropil-12-oxo-3,6,9-trioxa-13-azapentadecanamido)-5-ureidopentanamida (toxina

enlazadora 001)

A una solución agitada del Compuesto **13** (0.722 g, 0.584 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (4 mL) se le agregó el Compuesto **15** (0.314 g, 1.2 equiv) y diisopropiletilamina (0.305 mL, 3.0 equiv). El análisis de HPLC-MS a las 2 h indicó que no quedaba material de partida. La reacción se acidificó con TFA (300 μ L) y, luego, se diluyó con diH₂O + TFA 0.1 % (9 mL). La solución resultante se cargó en una columna C18 de 120 g Biotage® SNAP Ultra (Biotage, Uppsala, Suecia) y se purificó con gradiente de ACN/H₂O + TFA 0.1 %: ACN 20-60 % en 10 volúmenes de columna, ACN 60-100 % en 5 volúmenes de columna. El producto eluyó con ACN cerca de 40 %. Las fracciones puras identificadas por LCMS se agruparon y se liofilizaron. Se recuperó un polvo blanco sólido del liofilizador. La liofilización se repitió a una concentración alta (aprox. 50 mg/mL en H₂O/ACN 2:1) en un vial para producir un sólido liofilizado menos floculante y más sólido (754.2 mg, 91 %). MS *m/z* obs. = 647.4 ((*M*+2)/2), 1292.8 (*M*+1).

Ejemplo 4: Preparación de v10000 conjugado con la toxina enlazadora 001

Una solución (138.9 mL) del anticuerpo v10000 (2.0 g) en acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9 % (p/v), pH 4.5 se sometió a ajuste de pH mediante la adición de Na₂HPO₄ 200 mM, pH 8.9 (15.4 mL). Después de la adición de una solución de DTPA (44 mL en PBS, pH 7.4, concentración final 1.0 mM), se inició la reducción de los disulfuros entre cadenas mediante la adición de una solución acuosa de TCEP 10 mM (1.68 mL, 1.05 eq.). Después de 90 minutos a 37 °C, la reacción se enfrió en hielo antes de la adición de un exceso de toxina enlazadora 001 (4.81 mL; 6 eq) a partir de una solución madre de DMSO 20 mM. La reacción de conjugación se inactivó después de 90 minutos mediante la adición de un exceso de solución de *N*-acetil cisteína 20 mM (4.81 mL; 6 eq.).

La solución inactivada de conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC) se purificó con 9-15

diavolumenes de acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9 % (p/v), pH 4.5 en un instrumento de filtración de flujo tangencial Millipore Labscale™ mediante el uso de un módulo de ultrafiltración Pellicon® XL (Ultracel® 30 kDa 0.005m²; Millipore Sigma). El ADC eluido se filtró de forma estéril (0.22 µm). Los ADC producidos a pequeña escala se purificaron en columnas de 40 KDa MWCO Zeba™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) acondicionadas previamente con PBS o acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9 % (p/v), pH 4.5.

Tras la purificación, la concentración de ADC se determinó mediante un ensayo de BCA con referencia a una curva estándar generada a partir de v10000. Alternativamente, las concentraciones se estimaron mediante la medición de la absorción a 280 nm ($\epsilon = 19\,5065\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

Las muestras de los ADC se evaluaron mediante SDS-PAGE no reductor y reductor. No se observaron bandas extrañas.

El anticuerpo y los ADC se analizaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) para estimar la relación de fármaco con respecto a anticuerpo (DAR). La cromatografía se realizó en una columna de etilo HIC Proteomix® (7.8x50 mm, 5 µm) (Sepax Technologies Inc., Newark, DE) mediante el empleo de un gradiente de MPA 80 %/MPB 20 % a MPA 35 %/MPB 65 % durante un período de 13.5 minutos a una velocidad de flujo de 1 mL/min (MPA = (NH₄)₂SO₄ 1,5 M, Na_xPO₄ 25 mM, y MPB = Na_xPO₄ 25 mM 75 %, isopropanol 25 %).

La relación promedio de fármaco con respecto a anticuerpo (DAR) de un ADC puede variar dependiendo de la cantidad de enlaces disulfuro liberados durante la reducción del anticuerpo. Una única reacción de conjugación que produce un ADC con una DAR promedio particular comprende una mezcla de especies. Para v10000 conjugado con la toxina enlazadora 001, se generó una mezcla de cuatro especies: anticuerpo no conjugado, ADC con una DAR de 2, ADC con una DAR de 4 y ADC con una DAR de 6.

Los resultados de la HIC indicaron que el ADC que comprendía v10000 conjugado con la toxina enlazadora 001 tenía una DAR promedio de 2.07. Las contribuciones individuales de las especies DAR0, DAR2, DAR4 y DAR6 a la DAR promedio de los ADC purificados se evaluaron mediante la integración del cromatograma HPLC-HIC. Cada pico en el cromatograma de HIC se aisló mediante cromatografía preparativa y la identidad del pico se verificó mediante LC-MS. El % de contenido de especies DAR individuales para cada variante (según lo determinado por HIC) se muestra en la Tabla G.

Tabla G: Distribución de DAR para ADC que comprenden v10000 y toxina enlazadora 001

DAR	% de área
0	23
2	56
4	17
6	4