

## **MOLÉCULAS DE ANTICUERPO Y CONJUGADOS**

### **REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

Esta solitud reivindica el beneficio según 35 U.S.C. §119(e) de la Solicitud de Patente Provisional N.º 63/263 835, presentada el 10 de noviembre de 2021, que se incorpora por  
5 referencia al presente documento en su totalidad a todos los efectos.

### **REFERENCIA A LA LISTA DE SECUENCIAS**

Esta solicitud incorpora por referencia una Lista de secuencias que se presenta con esta solicitud como un archivo de texto titulado “EGFCM-100 Lista de secuencias” creado el 17 de octubre de 2022 y que tiene un tamaño de 95 kilobytes.

### **CAMPO DE LA DIVULGACIÓN**

La presente divulgación se refiere a moléculas de anticuerpo que se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y/o c-Met y a conjugados que contienen estas moléculas de anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo y los conjugados encuentran aplicación en el tratamiento del cáncer, por ejemplo.

### **ANTECEDENTES**

Superar la resistencia a los fármacos es un gran desafío al que se enfrentan las terapias dirigidas contra el cáncer. Existen múltiples fármacos dirigidos a EGFR y c-MET que están aprobados o en desarrollo clínico, pero la resistencia de novo y adquirida limita su eficacia a largo plazo (Ou, 2016; Boccaccio, 2014; Karamouzis, 2009; Corso, 2010; Chong, 2013; Bertotti, 2015; Benedettini, 2010; Bean, 2007; Bardelli, 2013; Bachleitner-Hofmann, 2008). Los mecanismos de resistencia incluyen mutaciones secundarias, activación de módulos de señalización posteriores oncogénicos como KRAS, regulación por incremento de ligandos y amplificación de receptores de factores de crecimiento alternativos. Por ejemplo, la amplificación de MET o la sobreexpresión de proteínas se ha establecido bien como un mecanismo importante de resistencia clínica a los inhibidores de EGFR. Del mismo modo, la evidencia emergente sugiere que la activación de la ruta de EGFR puede conferir resistencia a los inhibidores dirigidos de c-MET (Engelman, 2007; Bertotti, 2015; Benedettini, 2010; Bean, 2007; Bardelli, 2013). Los conjugados de fármacos y anticuerpos (ADC) son una clase creciente de terapias dirigidas diseñadas para administrar de forma selectiva fármacos citotóxicos directamente a las células tumorales (Angevin, 2017; Junutula, 2016; Lambert, 2017; Nasiri, 2018; Sau, 2017; Phillips, 2016). En este contexto, el antígeno al que se dirige el anticuerpo se usa principalmente como un mango para la administración del fármaco citotóxico y el mecanismo de destrucción es generalmente distinto de la biología de la diana. Por lo tanto, los ADC tienen el potencial de evitar en gran medida la resistencia debido a la activación de receptores alternativos o rutas de señalización posteriores, siempre que la diana

esté presente. Sin embargo, los acontecimientos adversos debidos a la participación de la diana en las células normales pueden limitar el índice terapéutico de los ADC (Hinrichs, 2015; Donaghy, 2016; Sau, 2017). La tecnología de anticuerpos biespecíficos puede conferir especificidad adicional a los ADC al involucrar dos dianas distintas en las células tumorales para administrar de manera efectiva la carga útil citotóxica cuando ambas dianas están presentes (Comer, 2018; Andreev, 2017; Kontermann, 2015; Lü, 2017; Brinkmann, 2017; Fan, 2015; Mazor, 2017). Sin embargo, simplemente el direccionamiento a dos antígenos no garantiza una mejor selectividad para las células tumorales en comparación con las células normales distintas de la diana, ya que múltiples factores influyen en las propiedades de un anticuerpo biespecífico dado (Mazor, 2017; Mazor, 2015). Por lo tanto, sería deseable desarrollar ADC biespecíficos que tuvieran un direccionamiento mejorado de las células tumorales sin afectar el tejido normal. Un ADC de este tipo tendría el potencial de superar la resistencia a las terapias dirigidas debido a las alteraciones de la ruta, al tiempo que mantiene una ventana terapéutica al capitalizar el direccionamiento selectivo que ofrece el anticuerpo biespecífico.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, HER1, Erbb1) es el miembro fundador de la familia de tirosina cinasas del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano, Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER), que también incluye HER2/Erbb2, HER3/Erbb3 y HER4/Erbb4 (Arteaga, 2014; Rocha-Lima, 2007; Seshacharyulu, 2012; Vecchione, 2011; Nicholson, 2001). Se han aprobado numerosas terapias dirigidas contra EGFR, tanto en las clases de inhibidores de la tirosina cinasa (TKI) de molécula pequeña como en las biológicas (Troiani, 2016; Chong, 2013; Chan, 2017; Remon, 2018; Dokala, 2016). A pesar de estos éxitos, el beneficio clínico logrado por estas terapias está por debajo de lo que cabría esperar en función del amplio perfil de expresión de EGFR en muchos tipos de cáncer. Hay varios factores que contribuyen a las limitaciones clínicas observadas, que involucran mecanismos de resistencia tanto intrínsecos como adquiridos que se atribuyen en gran medida a alteraciones de las rutas de señalización (Chong, 2013). Por ejemplo, en el cáncer colorrectal (CCR), el EGFR se sobreexpresa en el 65-75 % o más de los pacientes, pero la tasa de respuesta objetiva de los anticuerpos anti-EGFR, como cetuximab y panitumumab, estuvo solo en el rango de ~10 % cuando se administró como monoterapia en poblaciones de pacientes no seleccionadas (Cunningham, 2004; Saltz, 2004). Estos anticuerpos solo son eficaces para pacientes cuyos tumores expresan KRAS de tipo salvaje (~50-55 % de los pacientes), lo que define la población de pacientes tratables (Jimeno, 2009; Knickelbein, 2015). Además, debido a los mecanismos de resistencia adicionales, solo alrededor de la mitad de los pacientes elegibles responden al tratamiento y finalmente todos

fallan en la terapia. El tratamiento de pacientes con agentes dirigidos contra EGFR se asocia frecuentemente con toxicidades cutáneas de moderadas a graves, que ocurren en un 65-90 % de los pacientes (Lacouture, 2006). Estas toxicidades cutáneas pueden ser de grado 3 a 4 de gravedad (criterios NCI-CTCAE) y pueden dar lugar a modificaciones de la dosis o a la interrupción del tratamiento. Por lo tanto, aunque se expresa en gran medida en una amplia gama de tipos de tumores, EGFR representa una diana desafiante para un enfoque de ADC, que podría exacerbar estas toxicidades observadas. El desarrollo de ADC que puedan dirigirse eficazmente a los tumores que expresan EGFR sin provocar toxicidades asociadas a EGFR inaceptables tendría el potencial de tratar un segmento más amplio de la población de pacientes con EGFR positivo en comparación con las terapias existentes.

c-MET es el producto génico del protooncogén MET, que está codificado en el cromosoma 7. La proteína c-MET es un receptor tirosina cinasa, expresado principalmente en la superficie de las células epiteliales, que reconoce solo un ligando conocido, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como factor de dispersión (Giordano, 1989; Prat, 1991). El eje de señalización de c-MET/HGF tiene un papel esencial en la regulación de la proliferación, diferenciación, motilidad y morfogénesis en varios procesos normales, incluida la cicatrización de heridas, la regeneración de tejidos y la organogénesis durante el desarrollo (Organ, 2011). Se ha informado una expresión aberrante y una desregulación de la ruta de c-MET para una amplia variedad de cánceres humanos, incluidos los cánceres de pulmón de células no pequeñas, colorrectal, gastrointestinal, de cabeza y cuello, pancreático, renal y hepatocelular, entre muchos otros (Organ, 2011; Birchmeier, 2003; Mo, 2017; Sierra, 2011; Trusolino, 2010; Peters, 2012; Vsiansky, 2018). Para muchas de estas indicaciones de cáncer, la sobreexpresión de c-MET se asocia negativamente con el pronóstico y la supervivencia (Yan, 2015; Kim, 2017a; Kim, 2017b; Kim, 2017c; Li, 2011; Kondo, 2013; Miyamoto, 2011; Liu, 2015; Miyamoto, 2011; Xu, 2016; Sacco, 2015; Gisterek, 2011; Belalcazar, 2012; Guo, 2014; Cappuzzo, 2009). Además, en algunos tipos de cáncer, c-MET se asocia con un fenotipo de células madre cancerosas, que se ha implicado en la resistencia a las terapias dirigidas a EGFR (Li, 2011; Boccaccio, 2014; Luraghi, 2014; Jun, 2013; De Bacco, 2012). Hay un cuerpo de literatura grande y creciente que demuestra que existe una interacción directa entre las rutas de señalización de EGFR y c-MET, y que esta interacción se traduce funcionalmente en resistencia a las terapias dirigidas a EGFR y c-MET en la clínica (McDermott, 2010; Moores, 2016; Suda, 2010; Zucali, 2008; Liska, 2011; Huang, 2014; Boccaccio, 2014; Madoz-Gúrpide, 2016; Sohn, 2014; Rho, 2009; Puri, 2008; Peters, 2012; Karamouzis, 2009; Jun, 2013; Haura, 2013; Guo, 2008; Gou, 2016; Engelman, 2007; Cecchi, 2012; Bardelli, 2013). Sobre la base de la amplia evidencia del papel de c-MET como

un indicador de pronóstico negativo independiente en muchos tipos de tumores y su implicación como mecanismo de resistencia a los inhibidores de EGFR, se han realizado múltiples esfuerzos para desarrollar inhibidores de c-MET como terapia contra el cáncer. Sin embargo, a pesar de la alta frecuencia de expresión de c-MET en múltiples tipos de tumores, el desarrollo de inhibidores efectivos de c-MET se ha enfrentado a importantes desafíos y contratiempos en la clínica (Zhang, 2015; Wu, 2017; Ariyawutyakorn, 2016; Maraño, 2015; Garber, 2014). Por ejemplo, mientras que crizotinib, un inhibidor dual de c-MET y ALK, ha sido aprobado para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas, otros fármacos dirigidos a c-MET, como el anticuerpo c-MET de un solo brazo, MetMab (onartuzumab) y el inhibidor de molécula pequeña, tivantinib, han fallado en los ensayos clínicos de fase III de última etapa debido a la falta de eficacia (Mo, 2017; Zhang, 2015; Wu, 2017; comunicados de prensa de la empresa). Una hipótesis plausible para la discrepancia entre el amplio perfil de expresión de c-MET y la respuesta clínica limitada de los inhibidores de c-MET es que solo un subconjunto de estos tumores son impulsados por la ruta de c-MET y, por lo tanto, muchos tumores que expresan c-MET son insensibles a los inhibidores que bloquean la actividad de señalización de c-MET. Hay varios inhibidores de c-MET en desarrollo clínico en curso, y algunos de estos programas buscan emplear una estrategia impulsada por biomarcadores para identificar la fracción de pacientes cuyos tumores dependen de c-MET (Choueiri, 2017; Zhang, 2016; Bouattour, 2018). La experiencia clínica hasta la fecha sugiere que, al igual que con los inhibidores de EGFR, el desarrollo exitoso de nuevos inhibidores de bloqueo de la señal de c-MET beneficiará solo a un subconjunto de la población total de pacientes con tumores que expresan c-MET. El desarrollo de un ADC dirigido a c-MET eficaz podría superar algunas de las limitaciones de los inhibidores de c-MET que bloquean la señal.

El concepto de conjugados de fármacos y anticuerpos (ADC) es simple, con el objetivo de producir un fármaco que tenga una amplia ventana terapéutica mediante el uso de la exquisita especificidad de los anticuerpos para administrar con precisión una ojiva citotóxica a las células cancerosas mientras causa un daño mínimo al tejido normal (Comer, 2018; Nasiri, 2018; Sau, 2017; de Goeij, 2016; Bouchard, 2014; Junutula, 2016; Lambert, 2017). Aunque el concepto es simple, lograr la combinación ideal de propiedades del ADC ha demostrado ser un desafío, como lo refleja el número limitado de ADC que se han aprobado hasta la fecha (Tolcher, 2016). Los últimos años han sido testigos de un campo en crecimiento, con ADC en etapa clínica que actualmente cuenta con más de 70 candidatos a fármacos en desarrollo. A pesar de los éxitos hasta la fecha y la perspectiva de que los nuevos ADC lleguen a los pacientes en los próximos años, quedan muchos desafíos y hay un margen sustancial para mejorar. En última instancia, el desafío clave en el desarrollo de un ADC es equilibrar su

eficacia y seguridad. Actualmente, hay un ADC dirigido por EGFR, depatuxizumab mafodotin (ABT-414), en fase III de desarrollo clínico por AbbVie para el glioblastoma (Phillips, 2016). ABT-414 se probó previamente en ensayos de fase II para múltiples indicaciones adicionales de tumores sólidos (ClinicalTrials.gov: NCT01741727). El ADC mostró una eficacia limitada a las dosis toleradas en estas indicaciones, y se observaron con frecuencia toxicidades oculares preocupantes en los pacientes tratados (Tolcher, 2014). Un ADC de EGFR de segunda generación, ABBV-221, estaba en desarrollo clínico, pero se suspendió debido a problemas de seguridad (Phillips, 2018; Calvo, 2017; presentación de la compañía). Actualmente, hay un ADC dirigido a c-MET, Telisotuzumab Vedotin (ABBV-399), que está entrando en fase II de desarrollo clínico para pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) cuyos tumores expresan altos niveles de c-MET, tanto como monoterapia y en combinación con el inhibidor de EGFR, erlotinib (Angevin, 2017; Wang, 2017). La combinación de ADC de c-MET ADC + TKI de EGFR ha mostrado actividad clínica en ensayos de Fase I en esta población de pacientes seleccionada, con neuropatía periférica y erupción cutánea como los acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento más frecuentes (Angevin, 2017; Calvo, 2017). La naturaleza de los anticuerpos biespecíficos permite un ajuste fino de las interacciones entre cada diana para impactar en las propiedades generales de la molécula, lo que podría producir un ADC con una ventana terapéutica aceptable (Comer, 2018). Este concepto ha sido probado para EGFR y c-MET *in vitro*, pero los investigadores aún tienen que demostrar la prueba del concepto *in vivo* de una mejora en la seguridad o la eficacia en comparación con los ADC de EGFR y c-MET mencionados anteriormente (Sellmann, 2016). Por lo tanto, sería beneficioso aprovechar las estrategias de anticuerpos biespecíficos para desarrollar un ADC de EGFR-cMET que demuestre eficacia y un perfil de seguridad aceptable.

La presente divulgación ha sido diseñada a la luz de las consideraciones anteriores.

## **COMPENDIO DE LA DESCRIPCIÓN**

La presente descripción proporciona moléculas de anticuerpo y conjugados que tienen combinaciones de propiedades biofísicas y/o funcionales deseables en comparación con las moléculas de anticuerpo descritas en la técnica anterior.

Los aspectos de la divulgación se refieren a una molécula de anticuerpo que puede unirse tanto a EGFR como a c-Met. EGFR y c-Met se coexpresan en muchos tipos de cáncer y las moléculas de anticuerpo que se dirigen a ambas moléculas ("moléculas de anticuerpo biespecíficas") brindan la oportunidad de un amplio beneficio clínico en múltiples indicaciones. La molécula de anticuerpo representa un tratamiento mejorado para los cánceres en comparación con los anticuerpos monoespecíficos contra EGFR o c-Met del estado de la técnica, porque las moléculas de anticuerpo biespecíficas descritas en el presente documento

pueden unirse a ambas dianas simultáneamente y, por lo tanto, han aumentado su selectividad para los tumores que coexpresan EGFR y c-MET en comparación con tejidos normales.

5 Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona una molécula de anticuerpo que comprende:

un primer dominio de unión a antígeno que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); y

un segundo dominio de unión a antígeno que se une a c-Met,

en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende:

10 (i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDR):

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3,

15 o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de HCDR1, HCDR2 o HCDR3 están sustituidos por otro aminoácido; y

(ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende las siguientes CDR:

LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4

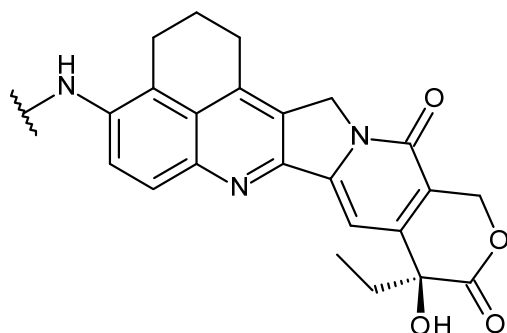
LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5

20 LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6,

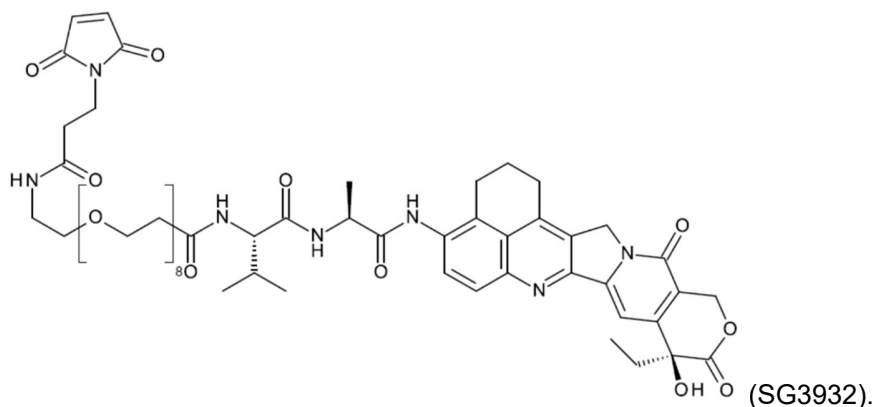
o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de HCDR1, HCDR2 o HCDR3 están sustituidos por otro aminoácido.

En particular, los conjugados que contienen esta molécula de anticuerpo pueden administrar selectivamente un fármaco (también denominado "carga útil" u "ojiva") a tumores  
25 que coexpresan estas dianas y tratar estos tumores con un alto grado de eficacia. Los ejemplos demuestran que diferentes conjugados que comprenden ojivas alternativas (p. ej., una tubulisina o un inhibidor de la topoisomerasa I) muestran una fuerte actividad citotóxica tanto en ensayos de citotoxicidad *in vitro* como en modelos de tratamiento del cáncer *in vivo*.

Así, en otro aspecto, la descripción proporciona un conjugado que comprende una  
30 molécula de anticuerpo descrita en el presente documento conjugada con un fármaco. En algunos casos, el fármaco es un inhibidor de la topoisomerasa I, por ejemplo un inhibidor de la topoisomerasa que tiene la fórmula A\*

**A\***

En algunos casos, la molécula de anticuerpo está conjugada con un inhibidor de topoisomerasa I que tiene la siguiente fórmula:



(SG3932).

En algunos casos, la molécula de anticuerpo comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une al EGFR humano con una "baja afinidad". Tal como se usa en el presente documento, "baja afinidad" se refiere a un primer dominio de unión a antígeno que se une al EGFR humano con una constante de disociación ( $K_d$ ) que es igual o superior a 10 nM. Tal como se demuestra en el presente documento, los anticuerpos y conjugados divulgados en el presente documento que comprenden un dominio de unión a antígeno EGFR de baja afinidad de este tipo muestran una toxicidad en la diana reducida en tejidos normales, como toxicidad en la piel, y por lo tanto tienen un perfil de seguridad mejorado en comparación con los conjugados que comprenden un dominio de unión a antígeno EGFR que se une al EGFR humano con una "mayor afinidad". Tal como se usa en el presente documento, "mayor afinidad" o "alta afinidad" se refiere a un primer dominio de unión a antígeno que se une al EGFR humano con una  $K_d$  inferior a 10 nM. Además, la divulgación demuestra que los conjugados que comprenden un dominio de unión a antígeno EGFR de baja afinidad son más eficaces para tratar el cáncer en comparación con los conjugados que comprenden un dominio de unión a antígeno EGFR de mayor afinidad (por ejemplo, FIG. 12).

La divulgación también proporciona moléculas de anticuerpo que comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une a EGFR y moléculas de anticuerpo que comprenden un segundo dominio de unión a antígeno que se une a c-Met, tal como se define en el presente documento.

5 Además, la descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de anticuerpo definidas en el presente documento o los conjugados definidos en el presente documento.

La descripción proporciona moléculas de anticuerpos, conjugados y composiciones farmacéuticas, todos tal como se definen en el presente documento, para su uso en un  
10 método de tratamiento del cuerpo humano o animal, tal como un método de tratamiento de un cáncer. La descripción proporciona métodos para tratar cáncer que comprenden administrar una molécula de anticuerpo, un conjugado o una composición farmacéutica tal como se define en el presente documento. En particular, la divulgación proporciona métodos para tratar un  
15 cáncer seleccionado de cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SQHN), que comprenden administrar una molécula de anticuerpo, un conjugado o una composición farmacéutica tal como se define en el presente documento. En algunos casos, el cáncer para el tratamiento es NSCLC.

La divulgación también proporciona ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras  
20 tal como se define en el presente documento. Además, la descripción proporciona un método para producir una molécula de anticuerpo tal como se define en el presente documento.

La divulgación incluye la combinación de los aspectos y las características preferidas descritas, excepto cuando dicha combinación sea claramente inadmisibles o se evite expresamente.

25

### **SUMARIO DE LAS FIGURAS**

Los ejemplos y experimentos que ilustran los principios de la divulgación se explicarán ahora con detalle con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

**FIG. 1A.** Representación gráfica de RAA22/B09-57. Se muestran los Fab de anti-EGFR RAA22, Fab de anti-cMET B09-57 y las cadenas pesadas ojal y botón. La  
30 representación estructural es un compuesto de estructuras de dominio individuales.

**FIG. 1B.** Representación gráfica de QD6/B09-57. Se muestran los Fab de anti-EGFR QD6 y las cadenas pesadas ojal y botón. La representación estructural es un compuesto de estructuras de dominio individuales.

**FIG. 2.** Se realizaron estudios de unión concurrente usando el formato de captura de  
35 antígeno mediante análisis Octet. Se expusieron sensores cargados con antígeno cMET

humana a interacciones sucesivas de asociación y disociación primero con anticuerpos y luego con antígeno EGFR humano. Ass: asociación; Diss: disociación; NI-NTA: ácido nitrilotriacético de níquel.

**FIG. 3A.** Resultados de ELISA que muestran reactividad cruzada de especies EGFR y c-Met. La IgG de EGFR monoespecífica de alta afinidad, QD6, así como el DuetMAb de EGFR/cMET biespecífico monovalente, QD6/B09, se unieron al EGFR humano, de macaco cynomolgus y de ratón. La IgG de EGFR monoespecífica de afinidad reducida, RAA22, se unió más débilmente al EGFR humano, de macaco cynomolgus y de ratón en comparación con QD6 y el correspondiente DuetMAb de EGFR/c-Met biespecífico monovalente, RAA22/B09, mostró una unión aún más débil a EGFR humano y de macaco cynomolgus con respecto a la IgG parental bivalente, RAA22, y la unión nominal a EGFR de ratón. La IgG de c-Met monoespecífica, B09, así como todas las variantes biespecíficas, mostraron una unión comparable a la c-Met humana y de macaco cynomolgus, pero ninguna unión detectable a la c-Met de ratón.

**FIG. 3B** Resultados de ELISA que muestran especificidad de familia EGFR y c-Met. Ninguno de los anticuerpos probados mostró una unión apreciable a ninguna de las proteínas de la familia EGFR HER (HER2, HER3 o HER4) ni a ninguno de los miembros de la familia c-Met (Ron (CD136) o Semaphorin 3a).

**FIG. 4** La internalización de Acm biespecífico RAA22/B09 y el tráfico a compartimentos intracelulares acidificados se visualizó utilizando anticuerpos marcados con colorante sensible al pH pHAb (Promega). Los anticuerpos de control incluyeron el control de isotipo R347 y los anticuerpos de control biespecíficos monovalentes anti-EGFR RAA22/R347 y anti-cMET B09/R347. Los anticuerpos marcados con pHAb se incubaron con células de cáncer de pulmón NCI-H1975 a una concentración de 1.25 ug/ml en una incubadora humidificada a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub>. Las imágenes fluorescentes se capturaron en los puntos de tiempo indicados en un sistema Operetta High Content Imaging utilizando el filtro Cy3. El aumento de la intensidad de la fluorescencia celular a lo largo del tiempo se consideró evidencia de internalización y tráfico hacia compartimentos intracelulares ácidos, tal como se mide por el flúor sensible al pH.

**FIG. 5** Tal como en la FIG. 4, se visualizó la internalización de Acm biespecífico RAA22/B09 y el tráfico hacia compartimentos intracelulares acidificados utilizando anticuerpos marcados con colorante sensible al pH pHAb, pero las células se trataron con anticuerpos a la concentración más baja de 0.625 ug/ml.

**FIG. 6A.** Cinética de internalización de anticuerpos monoclonales (Acm) QD6/B09 y RAA22/B09 en células H1975. (a) Superposiciones de imágenes de células marcadas con

CellTracker Blue CMAC para citoplasma (azul) y con 2.5 ug/ml de QD6/B09-AlexaFluor647 (magenta, panel superior) o 2.5 ug/ml de RAA22/B09AlexaFluor-647 (magenta, panel inferior) al comienzo de la internalización y 1 hora después. Las células se marcaron con CellTracker Blue CMAC, luego se unieron con mAbs-AlexaFluor6457 a 2-8 °C y se sometieron a condiciones de internalización: (37 °C, un 70 % de humedad y un 5 % de CO<sub>2</sub>).

**FIG. 6B.** Cinética de internalización de anticuerpos monoclonales (Acm) QD6/B09 y RAA22/B09 en células H1975. Evolución temporal de la internalización de mAb-AlexaFluor647 determinada por análisis cuantitativo de imágenes cinéticas utilizando el algoritmo (Material y Métodos). Las imágenes cinéticas tomadas a intervalos de 5 minutos se procesaron utilizando el algoritmo (Vainshtein, 2015) para determinar la acumulación de anticuerpos en el citoplasma. Las señales de anticuerpos en el citoplasma normalizadas con respecto a la fluorescencia de anticuerpos en la célula (fracción en el citoplasma) para QD6/B09-AlexaFluor647 (rojo) versus RAA22/B09-AlexaFluor647 (azul) se muestran para uno de los tres experimentos independientes. La constante de tasa de internalización ( $k_{int}$ ) se calculó a partir del curso temporal de la internalización utilizando el ajuste de curva con la ecuación  $F_{cit}(t) = (1 - e^{-k_{int} \cdot t}) \cdot F_{máx, cit}$ , donde  $F_{máx, cit}$  es la relación máxima entre la intensidad citoplásmica por célula y la intensidad total por célula.  $T_{1/2}$  calculado a partir de  $k_{int}$  fue  $37.5 \pm 10.6$  min para QD6/B09 y  $43.2 \pm 15.5$  para RAA22/B09 (de  $n = 3$ ).

**FIG. 7A.** Perfiles de internalización de DuetMAb QD6/B09 y sus respectivos anticuerpos de control de un solo brazo. Los perfiles de internalización se muestran a través del transcurso del tiempo de las respectivas señales de membrana y citoplasma para cada construcción. El conjunto QD6/B09 se adquirió utilizando un microscopio de fluorescencia confocal Opera.

**FIG. 7B.** Perfiles de internalización de DuetMAb RAA22/B09 y sus respectivos anticuerpos de control de un solo brazo. Los perfiles de internalización se muestran a través del transcurso del tiempo de las respectivas señales de membrana y citoplasma para cada construcción. El conjunto se adquirió utilizando un microscopio de fluorescencia confocal de disco giratorio Zeiss.

Los perfiles idénticos para QD6/B09 y QD6/IgG indican el modo de internalización impulsado por el brazo de EGFR del DuetMAb QD6/B09, mientras que DuetMAb RAA22/B09 requiere la participación de los brazos de EGFR y c-MET para una internalización eficiente.

**FIG. 8A.** Perfil de internalización de ADC RAA22/B09-AZD1508 en células que expresan receptores de superficie celular diana c-MET y EGFR moderados y altos. Se muestran señales de membrana, citoplasma y totales para ADC RAA22/B09-AF647 en células H1975. Se muestra un experimento representativo de 2. Las células H1975 muestran una

caída simultánea en las intensidades total y de membrana, lo que indica la disociación del anticuerpo de la superficie celular.

**FIG. 8B** es equivalente a la FIG. 8A pero en células HCC827. Las células HCC827 tienen una señal total estable durante el transcurso del tiempo experimental. La disminución de la señal de la membrana se deriva de la internalización de anticuerpos.

**FIG. 9A.** Internalización de anticuerpos control de un solo brazo de ADC RAA22/B09-AZD1508 en células HCC827. Los perfiles de intensidad del brazo único RAA22/IgG son ~10 veces más bajos que los de RAA22/B09 debido a una unión más débil a EGFR a través de la unión del brazo único.

**FIG. 9B** El brazo único B09/IgG se disocia de la membrana celular tal como se señala por la caída simultánea en las señales total y de membrana a lo largo del tiempo.

**FIG. 10.** El bloqueo de EGFR o cMETR reduce la actividad biespecífica de ADC *in vitro*. Las células NCI H1975 se pretrataron con un exceso de anticuerpos parentales desarmados para bloquear EGFR o cMET. A continuación, se añadió ADC de EGFR-cMET (RAA22/B09-AZ1508) a las células en una serie de diluciones en serie 4X con una concentración final que oscilaba entre 67 nM y 0.0009 nM. Las células tratadas se cultivaron durante 72 horas en una incubadora humidificada a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub>. La actividad metabólica se determinó utilizando el ensayo de viabilidad luminiscente CellTiter-Glo (Promega). Los datos se representan como porcentaje de actividad metabólica en relación con el control no tratado. Los valores de CI50 se determinaron utilizando un análisis de regresión logística no lineal entre la viabilidad máxima (células no tratadas) y la respuesta máxima (inhibición máxima) con el software GraphPad Prism.

**FIG. 11.** Los ADC monovalentes contra EGFR o cMET tienen una actividad reducida *in vitro* en comparación con los ADC biespecíficos contra EGFR/cMET. Se construyeron ADC monovalentes, monoespecíficos emparejando cada brazo de unión con un brazo de control de isotipo no vinculante (R347) para producir ADC de EGFR (RAA22/R347-AZ1508) y ADC de anti-cMET (B09/R347-AZ1508). Los ADC se añadieron a células NCI H1975 en una serie de diluciones en serie 4X con una concentración final que oscilaba entre 67 nM y 0.0009 nM. El porcentaje de actividad metabólica se determinó tal como se describe en la FIG. 9.

**FIG. 12A** muestra los resultados de ensayos de PDX llevados a cabo en ratones para determinar la eficacia de los ADC de EGFR-cMET de alta afinidad (QD6/B09-AZ1508) y baja afinidad (RAA22/B09-AZ1508) en una gran cantidad de modelos de xenoinjerto derivados de paciente (PDX) de cáncer humano en ratones inmunodeficientes. Cada compuesto se probó a un nivel de dosis única de 3 mg/kg en un solo ratón para cada modelo PDX que representaba un tumor humano diferente. Se calculó el porcentaje de crecimiento tumoral en relación con

los tumores de control no tratados (%T/C) para los tumores que crecieron más que el volumen inicial y se calculó el porcentaje de regresión tumoral para los tumores que mostraron una reducción de tamaño en comparación con el volumen inicial del tumor. (A) muestra la comparación directa de los ADC de alta y baja afinidad en cada modelo y

5 **FIG. 12B** muestra gráficos en cascada para QD6/B09-AZ1508 en orden de rango de eficacia.

**FIG. 12C** muestra gráficos en cascada para RAA22/B09-AZ1508 en orden de rango de eficacia.

10 **FIG. 13.** Los estudios de eficacia *in vivo* para determinar el intervalo de dosis en modelos PDX se llevaron a cabo en ratones desnudos atímicos implantados unilateralmente en el flanco con fragmentos tumorales extraídos de animales hospedadores. El ADC de EGFR-cMET de alta afinidad, QD6/B09-AZ1508, se probó a niveles de dosis de 1 y 2 mg/kg y la variante con afinidad reducida para EGFR, RAA22/B09-AZ1508, se probó a 1, 2 y 3 mg/kg, tal como se indica en la figura. Las mediciones del volumen de tumor se tomaron dos veces  
15 por semana después del inicio de la dosificación y se trazaron como gráficos lineales del volumen de tumor a lo largo del tiempo. Las barras de error representan el error estándar de las medias (SEM) y las imágenes insertadas muestran la tinción inmunohistoquímica de EGFR y cMET para cada modelo, a partir de tejido tumoral tomado de un paso anterior del modelo.

**FIG. 14A** Eficacia *in vivo* de los ADC biespecíficos de EGFR-cMET en un modelo PDX  
20 pancreático subcutáneo y ortotópico. **A)** Eficacia *in vivo* del ADC QD6/B09 de alta afinidad en el modelo PDX subcutáneo MEDI-PANC-08,  $\lambda$  - no tratado,  $\nu$  - R347-AZ1508 (3 mg/kg – Q1Wx4),  $\pi$  - QD6/B09-1508 (1 mg/kg – Q1Wx4),  $\theta$  - QD6/B09-1508 (2 mg/kg – Q1Wx4) y  $\bullet$  - QD6/B09-1508 (3 mg/kg – Q1Wx4). Los volúmenes de tumor se midieron dos veces por semana.

25 **FIG. 14B** Eficacia *in vivo* del ADC RAA2/B09 de baja afinidad en el modelo PDX subcutáneo MEDI-PANC-08.  $\lambda$  - no tratado,  $\nu$  - R347-AZ1508 (3 mg/kg – Q1Wx4),  $\pi$  - RAA2/B09-1508 (1 mg/kg – Q1Wx4),  $\theta$  - RAA2/B09-1508 (2 mg/kg – Q1Wx4) y  $\bullet$  - RAA2/B09-1508 (3 mg/kg – Q1Wx4). Los volúmenes de tumor se midieron dos veces por semana.

30 **FIG. 14C** Obtención de imágenes de luciferasa del modelo PDX ortotópico (que expresa luciferasa) MEDI-PANC-08<sup>LUC</sup>. Los ratones fueron fotografiados semanalmente usando el sistema de obtención de imágenes *in vivo* IVIS Spectrum. Las imágenes se normalizan en todos los grupos y puntos de tiempo con la escala de radiancia (radiancia promedio [p/s/cm<sup>2</sup>/sr]) establecida entre la señal máxima (grupo control del día 21) y el fondo.

**FIG. 14D** Eficacia *in vivo* del ADC RAA2/B09 de baja afinidad en el modelo PDX subcutáneo MEDI-PANC-08.  $\lambda$  - no tratado,  $\nu$  - gemcitabina (75 mg/kg – Q3/4Dx5),  $\pi$  R347-AZ1508 (3 mg/kg – Q1Wx4),  $\theta$  - RAA2/B09-1508 (2 mg/kg – Q1Wx4) y  $\bullet$  - RAA2/B09-1508 (3 mg/kg – Q1Wx4). Los días de tratamiento se indican mediante las flechas, los volúmenes de tumor se midieron dos veces por semana. Los datos que se muestran en los paneles **A** y **B** son el volumen de tumor medio del grupo ( $\text{mm}^3$ )  $\pm$  SEM, en el panel **D** radiancia media del grupo [ $\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$ ]  $\pm$  SEM.

**FIG. 15A** Perfiles de concentración media-tiempo y parámetros farmacocinéticos medios de NCA para RAA22/B09-57-AZ1508 en ratones. La concentración del compuesto diana y la concentración total de anticuerpos se midieron con un ensayo de LC-MS/MS de inmunocaptura.

**FIG. 15B** Perfiles de concentración media-tiempo y parámetros farmacocinéticos medios de NCA para QD6/B09-57-AZ1508 en ratones. La concentración del compuesto diana y la concentración total de anticuerpos se midieron con un ensayo de LC-MS/MS de inmunocaptura.

El péptido tríptico característico en la región Fc del anticuerpo humano y la ojiva escindida se separaron mediante cromatografía de fase inversa (RPLC), seguida de detección usando supervisión de reacciones múltiples (MRM). El péptido característico en la región Fc (VVSVLTVLHQDWLNGK) se usó para calcular el Ac total, mientras que la ojiva liberada por digestión se usó para calcular el ADC RAA22/B09. El estándar interno utilizado en este experimento es un péptido o una proteína marcados isotópicamente (SiluMAb, Sigma-Aldrich) o una ojiva marcada isotópicamente. La relación del área del pico del analito frente a los estándares internos se utilizó para calcular frente a la curva estándar.

Las curvas estándares y los QC se preparan agregando ADC RAA22/B09 a diferentes niveles en la misma matriz que las muestras. El intervalo de cuantificación cubre 100 ng/ml-15,000 ng/ml, con el QC de dilución cubriendo hasta 525,000 ng/ml. La curva estándar se ajustó con el modelo más simple posible. La exactitud y precisión del ensayo está dentro del 20 % para todos los niveles excepto el LLOQ, que está en el 25 %.

**FIG. 16A** Perfiles de concentración media-tiempo para RAA22/B09-57-AZ1508 en macacos. Las muestras de plasma de macaco cynomolgus se extrajeron y procesaron utilizando el ensayo de LC-MS/MS de inmunocaptura y el análisis farmacocinético no compartimental tal como se describe en la FIG. 15.

**FIG. 16B** Perfiles de concentración media-tiempo para QD6/B09-57-AZ1508 en macacos. Las muestras de plasma de macaco cynomolgus se extrajeron y procesaron

utilizando el ensayo de LC-MS/MS de inmunocaptura y el análisis farmacocinético no compartimental tal como se describe en la FIG. 15.

**FIG. 16C** Parámetros farmacocinéticos medios de NCA para QD6/B09-57-AZ1508 en macacos. Los parámetros farmacocinéticos de NCA para QD6/B09-57-AZ1508 a 3 mg/kg en 20067312 se basaron en los datos farmacocinéticos después de la segunda dosis. Todos los demás resultados se basaron en datos farmacocinéticos después de la primera dosis. Las muestras de plasma de macaco cynomolgus se extrajeron y procesaron utilizando el ensayo de LC-MS/MS de inmunocaptura y el análisis farmacocinético no compartimental tal como se describe en la FIG. 15.

**FIG. 17** ADC de EGFR-cMET Maia Topoi se evaluó en modelos de xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) que representan múltiples tipos de cáncer humano en ratones inmunodeficientes como un ensayo PDX. El compuesto se probó a un nivel de dosis de 10 mg/kg en un solo ratón para cada modelo PDX que representaba un tumor humano único. Se calculó el porcentaje de crecimiento tumoral en relación con los tumores de control no tratados (%T/C) para los tumores que crecieron más que el volumen inicial (la inhibición del crecimiento tumoral (%TGI) se definió como el porcentaje de crecimiento del tumor frente al día 0 entre los grupos de tratamiento (TX) y control (C), según la fórmula:  $\%TGI = 1 - (TX_{final} - TX_{inicial}) / (C_{final} - C_{inicial})$ ), y se calculó el porcentaje de regresión tumoral para los tumores que mostraron una reducción de tamaño en comparación con el volumen de tumor inicial (el porcentaje de regresión tumoral se definió como el porcentaje de reducción de tumor de los tumores en los animales tratados en relación con el volumen de tumor del día 0 (día de la dosis inicial), calculado al final del estudio de acuerdo con la siguiente fórmula:  $\% \text{ de regresión} = (TX_{promedio \text{ final}} - TX_{promedio \text{ inicial}}) / (TX_{promedio \text{ inicial}}) \times 100$ ).

**FIG. 18** ADC de EGFR-cMET de Topoi TM se evaluó en modelos de xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) que representan múltiples tipos de cáncer humano en ratones inmunodeficientes como un ensayo PDX. El compuesto se probó a un nivel de dosis de 5 mg/kg en un solo ratón para cada modelo PDX que representaba un tumor humano único. Se calculó el porcentaje de crecimiento tumoral en relación con los tumores de control no tratados (%T/C) para los tumores que crecieron más que el volumen inicial (la inhibición del crecimiento tumoral (%TGI) se definió como el porcentaje de crecimiento del tumor frente al día 0 entre los grupos de tratamiento (TX) y control (C), según la fórmula:  $\%TGI = 1 - (TX_{final} - TX_{inicial}) / (C_{final} - C_{inicial})$ ), y se calculó el porcentaje de regresión tumoral para los tumores que mostraron una reducción de tamaño en comparación con el volumen de tumor inicial (el porcentaje de regresión tumoral se definió como el porcentaje de reducción de tumor de los tumores en los animales tratados en relación con el volumen de tumor del día 0 (día de la

dosis inicial), calculado al final del estudio de acuerdo con la siguiente fórmula: % de regresión =  $(\text{TXpromedio final} - \text{TXpromedio inicial}) / (\text{TXpromedio inicial}) \times 100$ ). **FIG. 19A** Se evaluaron dos ADC de EGFR-cMET diferentes con diferentes formatos de IgG Fc (Maia y TM) para la comparabilidad en el modelo PDX SQHN-02. Los ADC se probaron en 3 niveles de dosis: 2.5, 5 y 10 mg/kg y se comparó el crecimiento tumoral con animales de control no tratados. Se trataron un total de 10 animales por grupo de tratamiento y control.

**FIG. 19B** Se evaluaron dos ADC de EGFR-cMET diferentes con diferentes formatos de IgG Fc (Maia y TM) para la comparabilidad en el modelo PDX Panc-08. Los ADC se probaron en 3 niveles de dosis: 2.5, 5 y 10 mg/kg y se comparó el crecimiento tumoral con animales de control no tratados. Se trataron un total de 10 animales por grupo de tratamiento y control.

**FIG. 20** representa los resultados de los modelos PDX de NSCLC de cáncer de pulmón de células no pequeñas de la FIG. 17 anterior, destacando el estado de mutación de EGFR y la histología, cuando se conocen.

**FIG. 21** Los perfiles farmacocinéticos de los anticuerpos biespecíficos anti EGFR-cMET INT-009 (RAA22/B09-Acm desnudo de Maia) y ADC INT-009-SG3932 DAR8 ("ADC de MAIA") se compararon con B09/RAA2-IgG1-Acm espejo TM (INT-017) y ADC espejo TM-SG3932 DAR6 ("ADC de TM") en ratones NOD-SCID con dosis terapéuticas de 5 mg/kg.

**FIG. 22** muestra una comparación de la degradación de los receptores EGFR y cMET después del tratamiento con el ADC de EGFR-cMET Topoi TM frente a Amivantamab.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

Ahora se explicarán con detalle los aspectos y ejemplos de la presente divulgación con referencia a las figuras adjuntas. Otros aspectos y la divulgación resultarán evidentes para los expertos en la materia. Todos los documentos mencionados en este texto se incorporan en el presente documento por referencia.

#### **Dianas**

##### ***EGFR***

El EGFR humano (también conocido como protooncogén c-ErbB-1, receptor tirosina-proteína cinasa erbB-1 y EC 2.7.10.1) es la proteína identificada por UniProt P00533. El empalme alternativo de ARNm codificado por el gen *EGFR* humano (también conocido como *ERBB*, *ERBB1* y *HER1*) produce cuatro isoformas: isoforma 1 (UniProt: P00533-1, v2 (última actualización de secuencia: 1 de noviembre de 1997)); isoforma 2 (UniProt: P00533-2, v1), que comprende las sustituciones F404L y L405S con respecto a la isoforma 1, y que carece de la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 406 a 1210 de la isoforma 1; isoforma 3 (UniProt: P00533-3, v1), que comprende sustituciones en la posición 628 a 705 de la isoforma 1, y que carece de la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones

706 a 1210 de la isoforma 1; e isoforma 4 (UniProt: P00533-4), que comprende la sustitución C628S con respecto a la isoforma 1, y que carece de la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 629 a 1210 de la isoforma 1.

Se revisa la estructura y función de EGFR, por ejemplo, en Ferguson, Annu Rev Biophys. (2008) 37: 353-373. EGFR es una proteína transmembrana que es un receptor para los miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (familia EGF). El receptor comprende una región extracelular grande, un dominio transmembrana de expansión única, un dominio yuxtamembrana intracelular, un dominio de tirosina cinasa y una región reguladora C-terminal. La unión de EGFR a un ligando induce la dimerización del receptor y la autofosforilación de varios residuos de tirosina (Y992, Y1045, Y1068, Y1148 e Y1173) en la región reguladora C-terminal de EGFR.

La actividad / expresión aberrante de EGFR está implicada en muchas enfermedades, incluidos los trastornos del sistema nervioso y muchos tipos de cáncer.

En esta memoria descriptiva "EGFR" se refiere a EGFR de cualquier especie e incluye isoformas, fragmentos, variantes u homólogos de EGFR de cualquier especie.

#### *c-Met*

El c-Met humano (también conocido como receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR) o tirosina-proteína cinasa Met) es la proteína identificada por UniProt P08581. El empalme alternativo de ARNm codificado por el gen *MET* humano produce tres isoformas: isoforma 1 (UniProt: P08581-1, v4 (última actualización de secuencia: 7 de julio de 2009)); isoforma 2 (UniProt: P08581-2), en la que se inserta la secuencia de aminoácidos "STWWKEPLNIVSFLFCFAS" en la posición 755 de la isoforma 1; e isoforma 3 (UniProt: P08581-3) también conocido como variante 4 de met soluble, en la que la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 755 a 764 de la isoforma 1 se sustituye por "RHVNIALIQR" y que además carece de la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 765 a 1390 de la isoforma 1.

Se revisa la estructura de c-Met, por ejemplo, en Gherardi, 2003, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. c-Met es un heterodímero formado por una cadena alfa (50 kDa) y una cadena beta (145 kDa), que están unidas por enlaces disulfuro. c-Met comprende un dominio Sema N-terminal, que media la unión al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y un dominio de cinasa intracelular. La unión del ligando en la superficie celular induce la autofosforilación de c-Met en su dominio intracelular que proporciona sitios de acoplamiento para las moléculas de señalización posterior y la activación de varias cascadas de señalización.

c-Met se expresa en tejidos normales en la superficie de las células epiteliales. La sobreexpresión de c-Met se observa en muchos tumores y cánceres humanos, lo que frecuentemente se asocia con un fenotipo metastásico y un mal pronóstico. Los ejemplos de cánceres donde se han observado altos niveles de expresión de c-Met incluyen cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de mama y cáncer esofágico y gástrico. En estos cánceres, a menudo se observa la coexpresión de EGFR y c-Met.

#### Moléculas de anticuerpo

La presente divulgación proporciona moléculas de anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación pueden proporcionarse en forma aislada, en el sentido de estar libres de contaminantes, tales como anticuerpos que pueden unirse a otros polipéptidos y/o componentes del suero.

El término "molécula de anticuerpo" describe una inmunoglobulina ya sea natural o producida parcial o totalmente de manera sintética. La molécula de anticuerpo puede ser humana o humanizada. La molécula de anticuerpo es preferiblemente una molécula de anticuerpo monoclonal. Ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina, como la inmunoglobulina G (IgG), y sus subclases isotípicas, tal como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como fragmentos de las mismas.

El término "molécula de anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, incluye por tanto fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren unión a la(s) molécula(s) diana pertinente(s). Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fv, scFv, Fab, scFab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab<sub>2</sub>, diacuerpos, triacuerpos, scFv-Fc, minicuerpos y anticuerpos de un solo dominio (por ejemplo, VhH), etc.). A menos que el contexto requiera lo contrario, el término "molécula de anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, es equivalente por tanto a "molécula de anticuerpo o fragmento de la misma".

Las moléculas de anticuerpo y los métodos para su construcción y uso son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Holliger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 (2005). Es posible tomar moléculas de anticuerpo monoclonales y otras y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otras moléculas de anticuerpo o quiméricas que conserven la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar la introducción de CDR o regiones variables de una molécula de anticuerpo en una molécula de anticuerpo diferente (EP-A-184187, GB 2188638A y EP-A-239400).

En vista de las técnicas actuales en relación con la tecnología de anticuerpos monoclonales, las moléculas de anticuerpo pueden prepararse para la mayoría de los

antígenos. El dominio de unión a antígeno puede ser una parte de un anticuerpo (por ejemplo, un fragmento Fab) o un fragmento de anticuerpo sintético (por ejemplo, un fragmento Fv monocatenario (ScFv)). Los anticuerpos monoclonales adecuados para antígenos seleccionados pueden prepararse mediante técnicas conocidas, por ejemplo, las descritas en

5 "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques ", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications ", J G R Hurrell (CRC Press, 1982). Neuberger, 1988 analiza los anticuerpos quiméricos.

Las moléculas de anticuerpo según la presente divulgación comprenden un dominio de unión a antígeno. Un "dominio de unión a antígeno" describe la parte de una molécula que se une a todo o parte del antígeno diana. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo se podrá unir únicamente a una parte concreta del antígeno, y dicha parte se denomina un epítipo. Se puede proporcionar un sitio de unión antígeno-anticuerpo mediante uno o más dominios variables de anticuerpos. Un sitio de unión a antígeno de anticuerpo comprende preferiblemente una región ligera variable (VL) y una región pesada variable (VH). Las

10 regiones VH y VL de un dominio de unión a antígeno constituyen juntas la región Fv.

Un dominio de unión a antígeno generalmente comprende seis regiones determinantes de complementariedad (CDR); tres en la región VH: HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y tres en la región VL: LCDR1, LCDR2 e LCDR3. Las seis CDR juntas definen el parátipo del dominio de unión a antígeno, que es la parte del dominio de unión a antígeno que se une al antígeno diana.

20

La región VH y la región VL comprenden regiones marco (FR) a ambos lados de cada CDR, que proporcionan un andamiaje para las CDR. Desde el extremo N hasta el extremo C, las regiones VH comprenden la siguiente estructura: extremo N-[HFR1]-[HCDR1]-[HFR2]-[HCDR2]-[HFR3]-[HCDR3]-[HFR4]-extremo C; y las regiones VL comprenden la siguiente

25 estructura: extremo N-[LFR1]-[LCDR1]-[LFR2]-[LCDR2]-[LFR3]-[LCDR3]-[LFR4]-extremo C.

Existen varias convenciones diferentes para definir las CDR y FR de anticuerpos, como las descritas en Kabat, 1991, Chothia, 1987, la numeración de IMGT tal como se describe en LeFranc, 2015 y VBASE2, tal como se describe en Retter, 2005. Las CDR y FR de las regiones VH y VL de las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento se definieron según Kabat (Kabat, 1991).

30

Las moléculas de anticuerpo que comprenden al menos dos dominios de unión a antígeno, cada uno de los cuales puede unirse a una diana diferente, pueden denominarse "moléculas de anticuerpo biespecíficas". Por el contrario, las moléculas de anticuerpo que solo se unen a un solo objetivo (por ejemplo, EGFR o c-Met) se denominan "moléculas de anticuerpo monoespecíficas". La presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo

35

biespecífica que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a EGFR y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a c-Met.

*Dominios de unión a antígeno anti-EGFR*

5 El dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende las CDR de una molécula de anticuerpo que puede unirse a EGFR. En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende adicionalmente las FR de una molécula de anticuerpo que puede unirse a EGFR. Es decir, en algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende la región VH y la región VL de una molécula de anticuerpo que puede unirse a EGFR.

10 En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una región VH y una región VL que es, o que se deriva de, la región VH/VL de un clon de anticuerpo de unión a EGFR descrito en el presente documento (es decir, clones de anticuerpos anti-EGFR RAA22 o QD6). Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una región VH y una región VL que es, o que se deriva de, la  
15 región VH/VL de RAA22.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende las tres HCDR o tres LCDR, preferiblemente las tres VH CDR y las tres VL CDR, de los clones de anticuerpos anti-EGFR RAA22 o QD6, preferiblemente RAA22. Las secuencias de los dominios VH y VL de los anticuerpos RAA22 y QD6 se describen en el presente documento, y  
20 las tres CDR de dominio VH y tres CDR de dominio VL de dichos anticuerpos pueden determinarse así a partir de dichas secuencias.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una región VH según (1) o (2) a continuación:

(1) una región VH que comprende las siguientes CDR:

25 HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3,

o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de HCDR1, HCDR2 o HCDR3 están sustituidos por otro aminoácido, o

30 (2) una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3,

o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de  
35 HCDR1, HCDR2 o HCDR3 están sustituidos por otro aminoácido.

Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una región VH según (1) anteriormente.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una región VH según (1) o (2) anteriormente, en donde la región VH comprende además las FR según (3) a continuación:

- (3) HFR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8
- HFR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9
- HFR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10
- HFR4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,
- o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de HFR1, HFR2, HFR3 o HFR4 están sustituidos por otro aminoácido.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una región VH que comprende las CDR según (1) o (2) anteriormente, y las FR según (3) anteriormente.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una región VH según (4) o (5) a continuación:

- (4) una región VH que comprende las CDR según (1) y las FR según (3),
- (5) una región VH que comprende las CDR según (2) y las FR según (3).

Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una región VH según (4) anteriormente.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una región VH según (6) o (7) a continuación:

- (6) una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente un de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

- (7) una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente un de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una región VH según (6) anteriormente.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una región VL según (8) o (9) a continuación:

- (8) una región VL que comprende las siguientes CDR:

LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4  
 LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5  
 LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6,  
 o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de  
 5 LCDR1, LCDR2 o LCDR3 están sustituidos por otro aminoácido.

(9) una región VL que comprende las siguientes CDR:

LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4  
 LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66  
 LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67,  
 10 o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de  
 LCDR1, LCDR2 o LCDR3 están sustituidos por otro aminoácido.

Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una  
 región VL según (8) anteriormente.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una  
 15 región VL según (8) o (9) anteriormente, en donde la región VL comprende además las FR  
 según (10) a continuación:

(10) LFR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12  
 LFR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13  
 LFR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14  
 20 LFR4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15,  
 o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de  
 LFR1, LFR2, LFR3 o LFR4 están sustituidos por otro aminoácido.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una  
 región VL que comprende las CDR según (8) o (9) anteriormente, y las FR según (10)  
 25 anteriormente.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una  
 región VL según (11) o (12) a continuación:

(11) una región VL que comprende las CDR según (8) y las FR según (10).

(12) una región VL que comprende las CDR según (9) y las FR según (10).

Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una  
 30 región VL según (11) anteriormente.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una  
 región VL según (13) o (14) a continuación:

(13) una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos  
 35 un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente un de al menos un 75 %, 80 %, 85

%, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

(14) una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente un de al menos un 75 %, 80 %, 85  
5 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una región VL según (13) anteriormente.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende una  
10 región VH según una cualquiera de (1) a (7) anteriormente, y una región VL según una cualquiera de (8) a (14) anteriormente. En algunos casos preferidos, el dominio de unión a antígeno comprende una región VH según una cualquiera de (1), (4) y (6) y una región VL según una cualquiera de (8), (11) y (13). En otros casos, el dominio de unión a antígeno comprende una región VH según una cualquiera de (2), (5) y (7) y una región VL según una  
15 cualquiera de (9), (12) y (14).

#### *Dominios de unión a antígeno anti-c-Met*

El dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende las CDR de una molécula de anticuerpo que puede unirse a c-Met. En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende adicionalmente las FR de una molécula de  
20 anticuerpo que puede unirse a c-Met. Es decir, en algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende la región VH y la región VL de una molécula de anticuerpo que puede unirse a c-Met.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende una región VH y una región VL que es, o que se deriva de, la región VH/VL de un clon de anticuerpo de unión a c-Met descrito en el presente documento (es decir, clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL).  
25

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende las tres HCDR o tres LCDR, preferiblemente las tres CDR de VH y las tres CDR de VL, del clon B09-GL del anticuerpo de unión a c-Met. Las secuencias de los dominios VH y VL de los anticuerpos B09-GL se describen en el presente documento, y las tres CDR de dominio VH y tres CDR de dominio VL de dichos anticuerpos pueden determinarse así a partir de dichas secuencias.  
30

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende una región VH según (15) a continuación:

35 (15) una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26,

o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de

5 HCDR1, HCDR2 o HCDR3 están sustituidos por otro aminoácido.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende una región VH según (15) anteriormente, en donde la región VH comprende además las FR según (16) a continuación:

(16) HFR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30

10 HFR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31

HFR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32

HFR4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33,

o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de

HFR1, HFR2, HFR3 o HFR4 están sustituidos por otro aminoácido.

15 En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende una VH de acuerdo con (17) a continuación:

(17) una región VH que comprende las CDR según (15) y las FR según (16).

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende una región VH según (18) a continuación:

20 (18) una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente un de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38.

25 En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende una región VL según (19) a continuación:

(19) una región VL que comprende las siguientes CDR:

LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27

LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28

LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29,

30 o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de LCDR1, LCDR2 o LCDR3 están sustituidos por otro aminoácido.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende una región VL según (19) anteriormente, en donde la región VL comprende además las FR según (20) a continuación:

35 (20) LFR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34

LFR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35

LFR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36

LFR4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37,

o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de

5 LFR1, LFR2, LFR3 o LFR4 están sustituidos por otro aminoácido.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende una región VL según (21) a continuación:

(21) una región VL que comprende las CDR según (19) y las FR según (20).

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende una  
10 región VL según (22) a continuación:

(22) una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente un de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

15 En algunos casos, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met comprende una región VH según una cualquiera de (15) a (18) anteriormente, y una región VL según una cualquiera de (19) a (22) anteriormente.

*Dominios de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo biespecífica*

La invención proporciona una molécula de anticuerpo (es decir, una molécula de  
20 anticuerpo biespecífica) que comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende las CDR de un dominio de unión a antígeno que puede unirse a EGFR, y un segundo dominio de unión a antígeno que comprende las CDR de un dominio de unión a antígeno que puede unirse a c-Met. En algunos casos, el primer dominio de unión a antígeno comprende las CDR y las FR de un dominio de unión a antígeno que puede unirse a EGFR y  
25 el segundo dominio de unión a antígeno comprende las CDR y las FR de un dominio de unión a antígeno que puede unirse a c-Met. Es decir, en algunos casos, la molécula de anticuerpo comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende la región VH y la región VL de un dominio de unión a antígeno que puede unirse a EGFR y un segundo dominio de unión a antígeno que comprende la región VH y la región VL de un dominio de unión a antígeno que  
30 puede unirse a c-Met.

En algunos casos, el primer dominio de unión a antígeno que se une a EGFR comprende la región VH y una región VL que es, o que se deriva de, la región VH/VL de un clon de anticuerpo de unión a EGFR descrito en el presente documento (por ejemplo, clones de anticuerpo anti-EGFR RAA22 o QD6, preferiblemente RAA22) y el segundo dominio de  
35 unión a antígeno que se une a c-Met comprende una región VH y una región VL que es, o que

se deriva de, la región VH/VL de un clon de anticuerpo de unión a c-Met descrito en el presente documento (por ejemplo, clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL). Un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a EGFR y comprende una región VH y una región VL que es, o que se deriva de, la región VH/VL del clon de anticuerpo de unión a EGFR RAA22, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a c-Met y comprende una región VH y una región VL que es, o que se deriva de, la región VH/VL del clon de anticuerpo que se une a c-Met B09-GL puede denominarse "RAA22/B09" o "molécula de anticuerpo biespecífico RAA22/B09".

En algunos casos, el primer dominio de unión a antígeno comprende:

una región VH según una cualquiera de (1) a (7) anteriormente y una región VL según una cualquiera de (8) a (14) anteriormente; y

el segundo dominio de unión a antígeno comprende:

una región VH según una cualquiera de (15) a (18) anteriormente y una región VL según una cualquiera de (19) a (22) anteriormente.

En algunos casos preferidos, el primer dominio de unión a antígeno comprende:

una región VH según cualquiera de (1), (4) y (6) anteriormente y una región VL según cualquiera de (8), (11) y (13) anteriormente; y

el segundo dominio de unión a antígeno comprende:

una región VH según cualquiera de (15) a (18) anteriormente y una región VL según cualquiera de (19) a (22) anteriormente.

Por ejemplo, en un caso preferido, una molécula de anticuerpo de la divulgación comprende:

un primer dominio de unión a antígeno que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); y

un segundo dominio de unión a antígeno que se une a c-Met,

en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDR):

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3,

o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de HCDR1, HCDR2 o HCDR3 están sustituidos por otro aminoácido; y

(ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende las siguientes CDR:

LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4

LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5

LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6,

o una variante de la misma en la que uno o dos o tres aminoácidos en una o más de HCDR1, HCDR2 o HCDR3 están sustituidos por otro aminoácido.

5 En un caso adicionalmente preferido, el primer dominio de unión a antígeno comprende:

una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y

10 una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20,

y/o el segundo dominio de unión a antígeno comprende:

una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y

15 una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

#### *Sustituciones de CDR*

En los casos de acuerdo con la presente descripción en los que se sustituyen uno o más aminoácidos con otro aminoácido, las sustituciones pueden ser conservadoras, por ejemplo según la siguiente tabla. En algunos casos, se sustituyen los aminoácidos del mismo 20 bloque en la columna central, es decir, se sustituye un aminoácido no polar por otro aminoácido no polar, por ejemplo. En algunos casos, se sustituyen los aminoácidos de la misma línea en la columna más a la derecha, es decir, G se sustituye por A o P, por ejemplo.

|    |           |                       |         |
|----|-----------|-----------------------|---------|
| 25 | ALIFÁTICO | No polar              | G A P   |
|    |           |                       | I L V   |
|    |           | Polar - no<br>cargado | C S T M |
|    |           |                       | N Q     |
|    |           | Polar - cargado       | D E     |
|    |           |                       | K R     |
| 30 | AROMÁTICO |                       | H V W Y |

30 En algunos casos, la(s) sustitución (sustituciones) pueden ser funcionalmente conservadoras. Es decir, en algunos casos la sustitución puede no afectar (o puede no afectar sustancialmente) a una o más propiedades funcionales (por ejemplo, afinidad de unión) del dominio de unión a antígeno que comprende la sustitución en comparación con el dominio de unión a antígeno no sustituido equivalente.

35

*Región constante*

En algunos casos, la molécula de anticuerpo descrita en el presente documento comprende una región constante de cadena pesada (CH) de inmunoglobulina. En algunos casos, la CH es, o se deriva de, la secuencia constante de la cadena pesada de una IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA (p. ej., IgA1, IgA2), IgD, IgE o IgM.

En algunos casos, la región CH es constante de inmunoglobulina G1 humana (IGHG1; UniProt: P01857-1, v1; SEQ ID NO: 42) o uno fragmento de la misma.

En algunos casos, la región CH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente uno de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 63 o 64. En casos preferidos, la región CH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente uno de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 o 64.

En algunos casos, la molécula de anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende o consiste en una región VH como se describe en el presente documento y una región CH como se describe en el presente documento.

En algunos casos, la molécula de anticuerpo descrita en el presente documento comprende una región constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina o un fragmento de la misma. En algunos casos, la región CL es, o se deriva de, una región CL kappa expuesta en SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48. En algunos casos, la región CL es, o se deriva de, una región CL lambda expuesta en SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 65. En algunos casos, la molécula de anticuerpo comprende: una primera región CL que es, o se deriva de, una región CL kappa expuesta en SEQ ID NO: 47 o 48; y una segunda región CL que es, o se deriva de, una región CL lambda expuesta en SEQ ID NO: 49 o 65.

En algunos casos, la molécula de anticuerpo descrita en el presente documento comprende:

una primera cadena pesada, en donde la primera cadena pesada comprende la región VH del primer dominio de unión a antígeno y una primera región constante de cadena pesada (CH) o un fragmento de la misma;

una primera cadena ligera, en donde la primera cadena ligera comprende la región VL del primer dominio de unión a antígeno y una primera región constante de cadena ligera (CL) o un fragmento de la misma;

una segunda cadena pesada, en donde la segunda cadena pesada comprende la región VH del segundo dominio de unión a antígeno y una segunda región constante de cadena pesada (CH) o un fragmento de la misma; y

5 una segunda cadena ligera, en donde la segunda cadena ligera comprende la región VL del segundo dominio de unión a antígeno y una segunda región constante de cadena ligera (CL) o un fragmento de la misma.

La primera y segunda región CH pueden ser idénticas o diferentes. En otras palabras, la primera y la segunda región CH pueden formar un homodímero o heterodímero. Por ejemplo, las moléculas de anticuerpo biespecíficas asimétricas tienen diferentes regiones CH primera y segunda, como se describe con más detalle a continuación. Las regiones CL primera y segunda pueden ser idénticas o diferentes. En algunos casos, la primera región CL es, o se deriva de, una región CL kappa expuesta en SEQ ID NO: 47 o 48; y una segunda región CL que es, o se deriva de, una región CL lambda expuesta en SEQ ID NO: 49 o 65.

Se entenderá que cuando una molécula de anticuerpo comprende una primera región VH y una primera región CH, estas regiones juntas forman una primera cadena pesada de la molécula de anticuerpo, es decir, que las regiones primera VH y primera CH están conectadas entre sí. De manera similar, una segunda región VH y una segunda región CH forman una segunda cadena pesada de la molécula de anticuerpo; una primera región VL y una primera región CL forman una primera cadena ligera de la molécula de anticuerpo; y una segunda región VL y una segunda región CL forman una segunda cadena ligera de la molécula de anticuerpo.

En algunos casos, la molécula de anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente uno de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de B-09-GL expuesta en SEQ ID NO: 50, la cadena pesada de QD6 expuesta en SEQ ID NO: 53, la cadena pesada de RAA22 expuesta en SEQ ID NO: 56, la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 59, o la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 60.

30 En algunos casos, la molécula de anticuerpo comprende una primera y una segunda cadena pesada, en donde

(i) la primera cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente uno de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97

%, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de B-09-GL expuesta en SEQ ID NO: 56; y

- (ii) la segunda cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente uno de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de RAA22 expuesta en SEQ ID NO: 50.

En algunos casos, la molécula de anticuerpo comprende una primera y una segunda cadena pesada, en donde

- (i) la primera cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente uno de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 59; y

- (ii) la segunda cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente uno de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 60.

- En algunos casos, la molécula de anticuerpo descrita en el presente documento comprende una cadena ligera que comprende o consiste en una región VL como se describe en el presente documento y una región CL como se describe en el presente documento.

- En algunos casos, la molécula de anticuerpo descrita en el presente documento comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente uno de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de B-09-GL expuesta en SEQ ID NO: 52, la cadena ligera de QD6 expuesta en SEQ ID NO: 55, la cadena ligera de RAA22 expuesta en SEQ ID NO: 58, la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 61, o la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 62.

En algunos casos, la molécula de anticuerpo descrita en el presente documento comprende una primera y una segunda cadena pesada, en donde

- (i) la primera cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente uno de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98

%, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de RAA22 expuesta en SEQ ID NO: 58; y

- (ii) la segunda cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente uno de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de B-09-GL expuesta en SEQ ID NO: 52

En algunos casos, la molécula de anticuerpo descrita en el presente documento comprende una primera y una segunda cadena pesada, en donde

- (i) la primera cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente uno de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 61; y

- (ii) la segunda cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente uno de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 62.

- La CH, CL, la cadena pesada y/o la cadena ligera de las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento pueden comprender una o más modificaciones, por ejemplo, para anular o reducir las funciones efectoras de Fc, promover la formación de una molécula de anticuerpo heterodimérica, para aumentar la eficacia del apareamiento de cadenas pesadas y ligeras afines, y/o ayudar con la formación de conjugados como se describe con más detalle a continuación. Una CH, CL, cadena pesada y cadena ligera que ha sido modificada puede denominarse CH, CL, cadena pesada y cadena ligera modificada, respectivamente.

- La molécula de anticuerpo puede comprender una mutación en la(s) región (regiones) CH de la(s) cadena(s) pesada(s) para reducir o anular la unión de la molécula de anticuerpo a uno o más receptores Fcγ, tal como FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII y/o a complemento. Tales mutaciones anulan o reducen las funciones efectoras de Fc. Las mutaciones para reducir o anular la unión de la molécula de anticuerpo a uno o más receptores Fcγ y a complemento son conocidas e incluyen la "triple mutación" o "TM" de L234F/L235E/P331S descrita por ejemplo en Organesyan, 2008. Otras mutaciones que se sabe que modulan la función efectora de anticuerpos se describen, por ejemplo, en Wang, 2018.

Por lo tanto, en algunos casos, la primera y/o la segunda cadena pesada (preferiblemente ambas) comprenden fenilalanina (F) en la posición 234, ácido glutámico (E) en la posición 235 y serina (S) en la posición 331, en donde la numeración es según el índice EU. Por ejemplo, una o ambas (preferiblemente ambas) de la primera y la segunda cadena pesada pueden comprender una región CH que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 42 y pueden comprender una fenilalanina (F) en la posición 234, ácido glutámico (E) en la posición 235 y serina (S) en la posición 331, en donde la numeración es según el índice EU. Tal como se demuestra en los ejemplos (por ejemplo, el Ejemplo 12), se demostró que incluir la TM en la cadena pesada mejora las propiedades farmacocinéticas de las moléculas de anticuerpo y los ADC ejemplificados.

Ejemplos de regiones CH que comprenden la triple mutación son SEQ ID NO: 63 y 64. Por lo tanto, en algunos casos, una de las cadenas pesadas primera y segunda comprende una región CH que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 63 y la otra cadena pesada comprende una región CH que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 64, en donde una o ambas (preferiblemente ambas) de las regiones CH comprenden una fenilalanina en la posición 234, ácido glutámico en la posición 235 y serina en la posición 331, en donde la numeración es según el índice EU.

Ejemplos de cadenas pesadas que comprenden una región CH que contiene la mutación triple son SEQ ID NO: 59 y 60. Por lo tanto, en algunos casos, una de las cadenas pesadas primera y segunda tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 59 y la otra cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 60, en donde una o ambas (preferiblemente ambas) de las cadenas pesadas comprenden una fenilalanina en la posición 234, ácido glutámico en la posición 235 y serina en la posición 331, en donde la numeración es según el índice EU.

La región VL y CL, y la región VH y la región CH1 de una molécula de anticuerpo juntas constituyen la región Fab. El resto de la molécula de anticuerpo constituye la región Fc.

A menos que se especifique lo contrario, las posiciones de los residuos de aminoácidos en el dominio constante, incluida la posición de las secuencias, sustituciones, deleciones e inserciones de aminoácidos tal como se describe en este documento, se enumeran según la numeración de EU (Edelman, 2007).

## 5 *Formatos biespecíficos*

Las moléculas de anticuerpo biespecíficas pueden proporcionarse en cualquier formato adecuado. Los formatos adecuados para una molécula de anticuerpo biespecífica descrita en este documento y métodos para producir la misma se describen en Kontermann, MAb 2012, 4(2):182-197 y Kontermann y Brinkmann 2015, 20(7): 838-847, ambos incorporados aquí como referencia en su totalidad. Véase en particular la FIG. 2 de Kontermann MAb 2012, 4(2): 182-19.

Las moléculas de anticuerpo biespecíficas también pueden generarse a partir de anticuerpos existentes mediante conjugación química. Por ejemplo, pueden acoplarse dos moléculas de IgG o dos fragmentos Fab' utilizando reactivos de acoplamiento homo- o hetero-bifuncionales, por ejemplo tal como se describe en Graziano y Guptill, Methods Mol Biol. 2004; 283:71-85.

En algunos casos, las moléculas de anticuerpo biespecíficas pueden ser una molécula de anticuerpo biespecífica de tipo inmunoglobulina G (tipo IgG). La molécula de anticuerpo biespecífica de tipo IgG puede comprender una región Fv, una región Fab o una sVD específica para un antígeno, una región Fv/Fab/sVD específica para otro antígeno y una región Fc. Las moléculas de anticuerpo biespecíficas de tipo IgG pueden ser simétricas o asimétricas. La molécula de anticuerpo biespecífica es preferiblemente asimétrica.

Las moléculas de anticuerpo biespecíficas similares a IgG simétricas generalmente contienen un dominio de unión a antígeno que se fusiona con el extremo N o C de la cadena pesada o ligera de una molécula de IgG, por ejemplo en forma de un fragmento scFv o un único dominio variable. Una propiedad característica de estas moléculas de anticuerpo biespecíficas similares a IgG simétricas es que contienen dos cadenas pesadas idénticas. Además, las moléculas de anticuerpo biespecíficas de tipo IgG simétricas son normalmente bivalentes para cada epítipo. La valencia, tal como se usa en el presente documento, se refiere al número de regiones de unión a antígeno en la molécula de anticuerpo que pueden unirse a un único epítipo. Una molécula de anticuerpo IgG monoespecífica monoclonal es bivalente para un único epítipo - contiene dos dominios de unión a antígeno, cada uno de los cuales puede unirse a un epítipo en una única molécula diana. Una molécula de anticuerpo biespecífica similar a IgG simétrica es bivalente para cada epítipo - normalmente contiene cuatro dominios de unión a antígeno, dos de los cuales pueden unirse a un primer epítipo en

una molécula diana y dos de los cuales pueden unirse a un segundo epítipo en una molécula diana.

Los ejemplos de moléculas de anticuerpo biespecíficas similares a IgG simétricas incluyen DVD-IgG, IgG-scFv, scFv-IgG, scFv<sub>4</sub>-Ig, IgG-scFab, scFab-IgG, IgG-sVD, sVD-IgG, 2 en 1-IgG, mAb<sup>2</sup>, tandemab common LC. Estas pueden formarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, reticulación química, hibridación somática o el método redox.

Las moléculas de anticuerpo biespecíficas similares a IgG asimétricas, por el contrario, suelen ser monovalentes para cada diana. Tal como se describe, por ejemplo, en Klein, 2012, se cree que el concepto de IgG biespecífica monovalente tiene un nicho terapéutico único en el sentido de que (i) no causan la homodimerización del receptor, (ii) tienen una toxicidad potencialmente reducida en tejidos no diana debido a la pérdida de avidéz por cada antígeno, y (iii) tienen una mejor selectividad cuando ambos antígenos se restringen selectivamente o se expresan abundantemente en las células diana. Por lo tanto, en algunos casos, la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo biespecífica similar a IgG asimétrica.

Las moléculas de anticuerpo biespecíficas similares a IgG asimétricas implican la heterodimerización de dos cadenas pesadas distintas y el emparejamiento correcto de la cadena ligera y la cadena pesada afines. La heterodimerización de las cadenas pesadas puede abordarse mediante varias técnicas, tal como botón en ojal, dirección electrostática de CH<sub>3</sub>, dominios modificados por ingeniería intercambiados con hebras de CH<sub>3</sub> y cremalleras de leucina. El emparejamiento de la cadena ligera y pesada correcta puede asegurarse mediante el uso de una de estas técnicas de heterodimerización de cadena pesada junto con el uso de una cadena ligera común, cruce de dominio entre CH<sub>1</sub> y CL, acoplamiento de las cadenas pesada y ligera con un ligador, ensamblaje in vitro de dímeros de cadena ligera y cadena pesada de dos monoclonales separados, ingeniería de interfaz de un dominio Fab completo o ingeniería de disulfuro de la interfaz CH<sub>1</sub>/CL.

Los ejemplos de moléculas de anticuerpo biespecíficas similares a IgG asimétricas incluyen DuetMab, kih IgG, kih IgG common LC, CrossMab, kih IgG-scFab, mAb-Fv, pares de carga y SEED-body.

En algunos casos, las moléculas de anticuerpo comprenden una o más modificaciones en uno o más de los dominios CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> que promueven la formación de una molécula de anticuerpo heterodimérica. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo DuetMab descrita anteriormente puede comprender adicionalmente una o más modificaciones en uno o más de los dominios CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> que promueven la formación de una molécula de anticuerpo heterodimérica. Esto puede implicar una estrategia de botón en ojal (KiH) basada en sustituciones de un único aminoácido en los dominios CH<sub>3</sub> que promueven la

heterodimerización de la cadena pesada que se describe en Ridgway, 1996. La cadena pesada CH3 variante de botón tiene un aminoácido pequeño que se ha reemplazado por uno más grande, y la variante de ojal tiene un aminoácido grande que se ha reemplazado por uno más pequeño. También se pueden introducir modificaciones adicionales para estabilizar la asociación entre las cadenas pesadas.

Las modificaciones de CH3 para mejorar la heterodimerización incluyen, por ejemplo, Y407V/T366S/L368A en una cadena pesada y T366W en la otra cadena pesada; y S354C/T366W en una cadena pesada y Y349C/Y407V/T366S/L368A en la otra cadena pesada, en donde la numeración de la región constante es según el índice EU.

Otros ejemplos de modificación de CH3 para mejorar la heterodimerización se describen, por ejemplo, en la Tabla 1 de Brinkmann y Kontermann, 2017 MABS 9(2), 182-212, que se incorpora en el presente documento específicamente por referencia.

En algunos casos, la molécula de anticuerpo comprende una primera y una segunda cadena pesada que forman un heterodímero, en donde una de las cadenas pesadas primera y segunda comprende un residuo de cisteína (C) en la posición 354 y un residuo de triptófano (W) en la posición 366 y la otra cadena pesada comprende un residuo de cisteína (C) en la posición 349, un residuo de valina (V) en la posición 407, una serina (S) en la posición 366 y una alanina (A) en la posición 368, en donde la numeración de la región constante es según el índice EU. Por ejemplo, una de las cadenas pesadas primera y segunda puede tener la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 42 y además puede comprender un residuo de cisteína (C) en la posición 354 y un residuo de triptófano (W) en la posición 366, y la otra cadena pesada puede tener la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 42 y además puede comprender un residuo de cisteína (C) en la posición 349, un residuo de valina (V) en la posición 407, una serina (S) en la posición 366 y una alanina (A) en la posición 368, en donde la numeración de la región constante es según el índice EU.

En algunos casos, la molécula de anticuerpo comprende:

- (i) una primera cadena pesada que comprende una primera región CH3 modificada, en donde la primera región CH3 modificada comprende un residuo de cisteína (C) en la posición 354 y un residuo de triptófano (W) en la posición 366; y
- (ii) una segunda cadena pesada que comprende una segunda región CH3 modificada, en donde la segunda región CH3 modificada comprende un residuo de cisteína (C) en la posición 349, un residuo de valina (V) en la posición 407, una serina (S) en la posición 366 y una alanina (A) en la posición 368,

en donde la numeración de la región constante es según el índice EU.

Un formato ilustrado particular de moléculas de anticuerpo biespecíficas similares a IgG asimétricas se denomina "DuetMab". Las moléculas de anticuerpo DuetMab utilizan la tecnología KIH para la heterodimerización de 2 cadenas pesadas distintas y aumentan la eficacia del emparejamiento de cadenas pesadas y ligeras afines al reemplazar el enlace disulfuro nativo en una de las interfaces CH1-CL por un enlace disulfuro modificado por ingeniería. La divulgación relacionada con DuetMab puede encontrarse, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 9.527.927 y Mazor, 2015, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

En algunos casos, la molécula de anticuerpo comprende:

- 10 (a) una región CH modificada, en donde la cadena pesada modificada comprende una sustitución de un aminoácido distinto de cisteína nativo por un aminoácido cisteína; y
- (b) una región CL correspondiente modificada, en donde la CL modificada comprende una sustitución de un aminoácido distinto de cisteína nativo por un aminoácido cisteína,
- 15 en donde o bien:
  - (i) la primera cadena pesada comprende la región CH modificada y la primera cadena ligera comprende la región CL correspondiente modificada; o
  - (ii) la segunda cadena pesada comprende la región CH modificada y la segunda cadena ligera comprende la región CL correspondiente modificada.

20 En algunos casos, la cisteína sustituida de la región CH modificada, que resulta de la sustitución del aminoácido distinto de cisteína nativo por el aminoácido cisteína, y la cisteína sustituida de la región CL correspondiente modificada, que resulta de la sustitución del aminoácido distinto de cisteína nativo por el aminoácido cisteína, pueden formar un enlace disulfuro.

25 En algunos casos, la región CH modificada comprende una sustitución de un aminoácido distinto de cisteína nativo por un aminoácido cisteína en la posición 126; y la región CL correspondiente modificada comprende una sustitución de un aminoácido distinto de cisteína nativo por una cisteína en la posición 121, en donde la numeración de la región constante es según el índice EU.

30 En algunos casos, la región CH modificada comprende una sustitución de un aminoácido distinto de cisteína nativo por un aminoácido cisteína en la posición 126 y una sustitución de un aminoácido cisteína nativo por un aminoácido distinto de cisteína en la posición 219, por ejemplo, por una valina; y la región CL correspondiente modificada comprende una sustitución de un aminoácido distinto de cisteína nativo por una cisteína en la

35 posición 121 y una sustitución de un aminoácido cisteína nativo por un aminoácido distinto de

cisteína en la posición 214, por ejemplo por una valina, en donde la numeración de la región constante es según el índice EU.

En algunos casos, la molécula de anticuerpo comprende una segunda región CH y una segunda cadena ligera correspondiente, en donde la segunda región CH y la segunda CL correspondiente no comprenden una sustitución de un aminoácido distinto de cisteína nativo por un aminoácido cisteína y no comprenden una sustitución de una cisteína nativa por un aminoácido distinto de cisteína.

### Conjugados

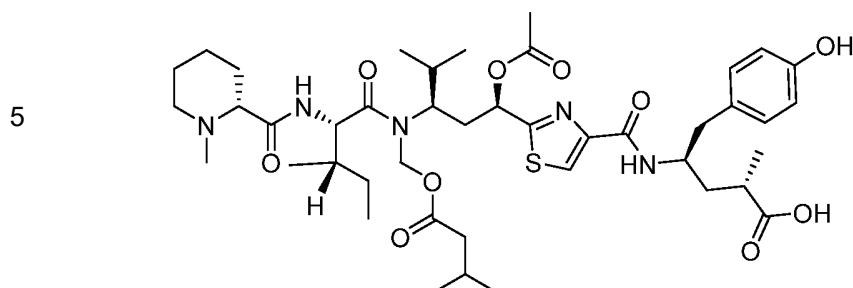
La molécula de anticuerpo puede conjugarse con un fármaco. En este caso, la molécula de anticuerpo puede denominarse "conjugado" o "conjugado de anticuerpo y fármaco". Dichos conjugados encuentran aplicación en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades como se describe en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, el fármaco puede denominarse "carga útil" u "ojiva".

En algunos aspectos, el fármaco comprende una citotoxina, un radioisótopo, un inmunomodulador, una citocina, una linfocina, una quimiocina, un factor de crecimiento, un factor de necrosis tumoral, una hormona, un antagonista de hormona, una enzima, un oligonucleótido, un ADN, un ARN, un ARNip, un iARN, un microARN, un agente terapéutico fotoactivo, un agente anti-angiogénico, un agente proapoptótico, un péptido, un lípido, un hidrato de carbono, un agente quelante o combinaciones de los mismos.

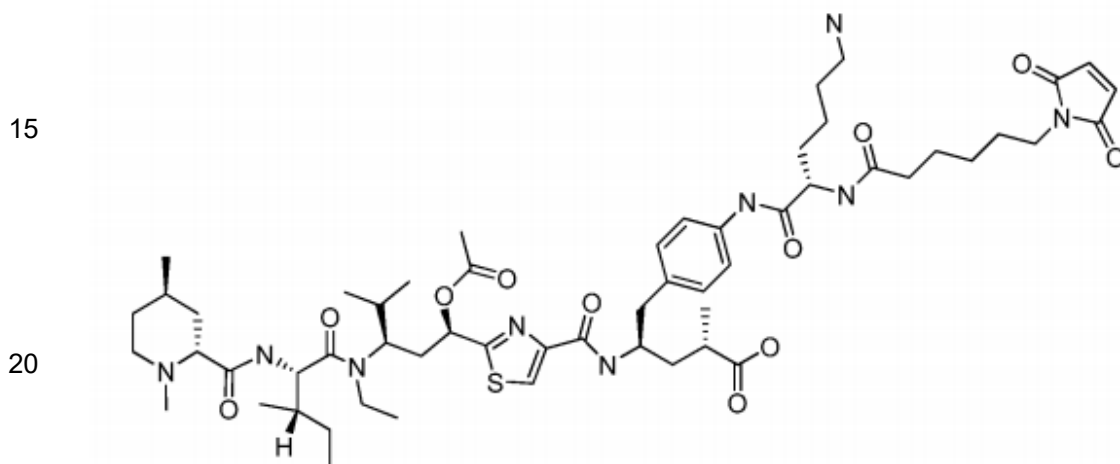
Una citotoxina es un compuesto que puede incluir la muerte de la célula a la que se dirige. Por lo general, en el contexto de los conjugados de anticuerpo y fármaco, se administra una citotoxina a una célula a la que se dirige la molécula de anticuerpo, donde se libera en la célula e induce la muerte celular. El uso de citotoxinas en conjugados de anticuerpo y fármaco se describe, por ejemplo, en Chalouni y Doll 2018 J Exp Clin Cancer Res. 37(1):20. En algunos casos, la citotoxina es una tubulisina, una auristatina, un maitansinoide, un inhibidor de la topoisomerasa o una pirrolobenzodiazepina (PBD).

En casos particulares, la citotoxina es o comprende una tubulisina. Las tubulisinas son una clase de tetrapéptidos citostáticos que contienen isoleucina y otros tres aminoácidos no naturales complejos Mep (ácido R—N-mepipecólico), Tuv (tubuvalina) y Tut (tubulirosina) o Tup (tubufenilalanina). Las tubulisinas son moléculas citotóxicas extremadamente potentes y son potentes contra líneas celulares resistentes a múltiples fármacos (Domling, 2005). Estos compuestos muestran alta citotoxicidad sometidos a prueba frente a un panel de líneas celulares de cáncer con valores de CI50 en el intervalo picomolar bajo; por tanto, son de interés como agentes terapéuticos contra el cáncer. Véase, por ejemplo, el documento WO2012019123. Los conjugados de tubulisina se divulgan, por ejemplo, en la patente de

EE.UU. n.º 7.776.814. En algunos casos, la tubulisina es tubulisina A que tiene la siguiente estructura química:



10 En algunos casos, la tubulisina es la tubulisina 1508, también denominada "AZ1508" y descrita con más detalle en el documento WO 2015157594. La tubulisina 1508 tiene la siguiente estructura química:



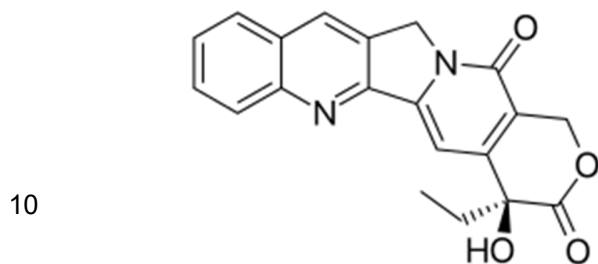
25 Preferiblemente, la citotoxina es o comprende un inhibidor de la topoisomerasa. El término "inhibidor de la topoisomerasa", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente citotóxico que inhibe la actividad de una o más de las enzimas topoisomerasa (topoisomerasa I y II), que son enzimas que juegan un papel importante en la replicación y transcripción del ADN mediante la regulación del superenrollamiento del ADN. Por lo tanto, se espera que los conjugados de anticuerpo y fármaco que comprenden un inhibidor de la

30 topoisomerasa como citotoxina interfieran con los procesos normales que involucran al ADN, conduciendo por tanto a la muerte celular. Se ha demostrado que los conjugados que contienen inhibidores de la topoisomerasa son eficaces contra una variedad de líneas celulares que contienen tumores, además de tener actividad anticancerígena en ensayos clínicos. Véase, por ejemplo, Ogitani, 2016a; Ogitani, 2016b; Cardillo, 2015; y Bardia, 2017.

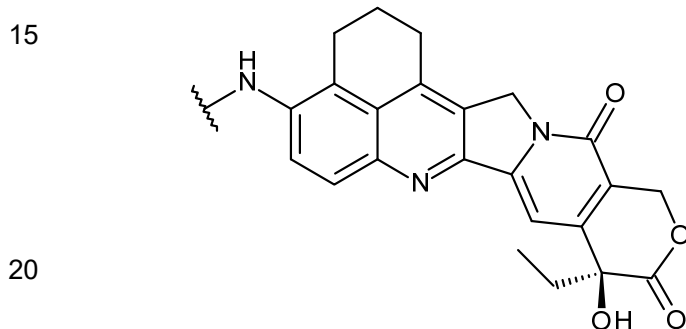
35 Se prefiere que la molécula de anticuerpo esté conjugada con un inhibidor de la topoisomerasa I. Ejemplos representativos de inhibidores de la topoisomerasa I incluyen, pero

no se limitan a, camptotecinas y sus análogos topotecán, irinotecán, belotecán, exatecán, lurotecán y sinotecán. Los ejemplos representativos de inhibidores de la topoisomerasa II incluyen, pero no se limitan a, amsacrina, daunorrubicina, doxorubicina, epipodofilotoxinas, elipticinas, epirubicina, etopósido, razoxano y tenipósido.

5 Un ejemplo de la estructura química de la camptotecina es la siguiente:



Un ejemplo general de un inhibidor de la topoisomerasa I adecuado se representa por el siguiente compuesto:



**A\***

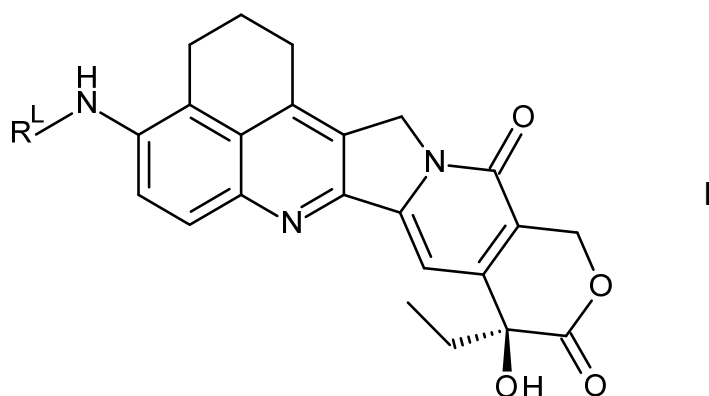
Dicho compuesto se denota como A\*.

25 El compuesto (p. ej., A\*) se proporciona preferentemente con un ligador para conectarse (preferiblemente conjugarse) a una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento (que puede denominarse una "unidad de ligando" o, alternativamente, un "agente de unión celular" (CBA)). De manera adecuada, el ligador se une (por ejemplo, se conjuga) de manera escindible a un residuo amino, por ejemplo, un aminoácido de una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento.

30 El diseño y la selección de los ligadores que van a usarse en los conjugados se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Beck, 2017. El ligador usado en el presente documento puede ser cualquiera de los ligadores descritos en Beck, 2017.

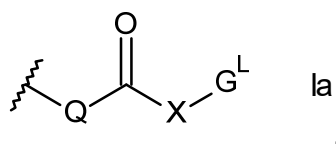
Más particularmente, un ejemplo de un inhibidor de la topoisomerasa I adecuado se representa por el siguiente compuesto, con la fórmula "I":

35



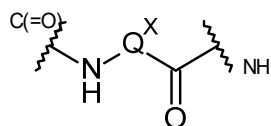
y sales y solvatos del mismo, en donde  $R^L$  es un ligador para la conexión con una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento, en donde dicho ligador se selecciona preferiblemente de:

(ia):



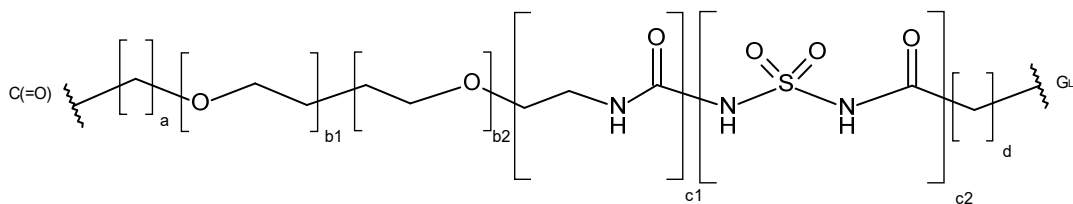
en donde

Q es:



, donde  $Q^X$  es tal que Q es un residuo aminoácido, un residuo dipeptídico, un residuo tripeptídico o un residuo tetrapeptídico;

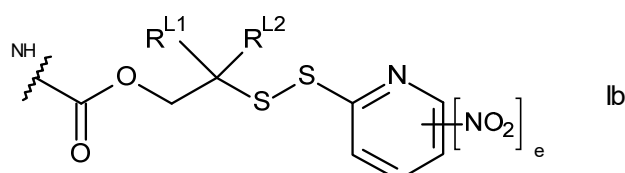
X es:



donde  $a =$  de 0 a 5,  $b_1 =$  de 0 a 16,  $b_2 =$  de 0 a 16,  $c_1 = 0$  o 1,  $c_2 = 0$  o 1,  $d =$  de 0 a 5, donde al menos  $b_1$  o  $b_2 = 0$  (es decir, solo uno de entre  $b_1$  y  $b_2$  puede no ser 0) y al menos  $c_1$  o  $c_2 = 0$  (es decir, solo uno de entre  $c_1$  y  $c_2$  puede no ser 0);

$G^L$  es un ligador para conectar con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento (por ejemplo, la unidad de ligando o el agente de unión celular); o

(ib):



10 donde  $R^{L1}$  y  $R^{L2}$  se seleccionan independientemente entre H y metilo o, junto con el átomo de carbono al cual están unidos, forman un grupo de ciclopropileno o ciclobutileno; y e es 0 o 1.

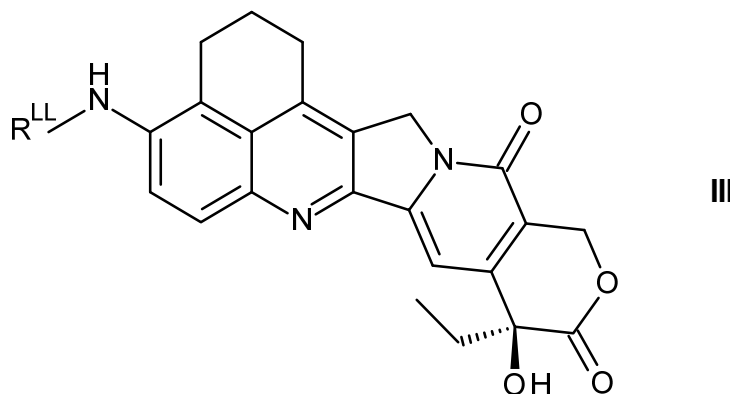
El experto en la técnica entenderá que más de uno de dicho(s) agente(s) (por ejemplo, inhibidor de la topoisomerasa I) puede conjugarse con la molécula de anticuerpo.

15 Por ejemplo, un conjugado (por ejemplo, conjugado de anticuerpo y fármaco) de la divulgación puede ser de la fórmula general IV:



o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, en donde L es una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento (por ejemplo, la unidad de ligando o CBA),  $D^L$  es un fármaco que tiene un ligador (p. ej., una unidad ligadora de fármaco), y p es un número entero de 1 a 20.

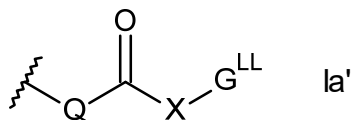
Preferiblemente,  $D^L$  es un inhibidor de la topoisomerasa I que tiene un ligador que es de fórmula III:



$R^{LL}$  es un ligador conectado con una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento (por ejemplo, la unidad de ligando), en donde el ligador se selecciona preferiblemente de

35

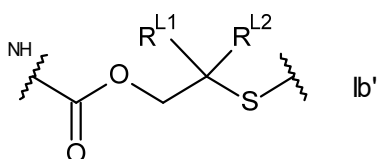
(ia'):



5

donde Q y X son como se definen anteriormente y  $\text{G}^{\text{LL}}$  es un ligador conectado con una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento (p. ej., la unidad de ligando o CBA); y

(ib'):



10

donde  $\text{R}^{\text{L1}}$  y  $\text{R}^{\text{L2}}$  son como se han definido anteriormente.

15

La carga de fármaco se representa por p, el número de inhibidor(es) de la topoisomerasa I (por ejemplo, unidades de fármaco) por molécula de anticuerpo (por ejemplo, unidad de ligando). La carga de fármaco puede oscilar entre 1 y 20 unidades de fármaco (D) por unidad de ligando. Para las composiciones, p representa la cantidad promedio de fármaco de los conjugados en la composición y p está comprendida en el intervalo de 1 a 20. En algunos casos, cuando el fármaco es un inhibidor de la topoisomerasa, el intervalo de p se selecciona de 2 a 8, preferiblemente de 4 a 8, incluso más preferiblemente de 5 a 7, aún más preferiblemente de 5.5 a 6.5. Tal como se describe en los ejemplos, se produjo un ADC que comprende el inhibidor de la topoisomerasa I SG3932 con una DAR promedio de 6 +/- 6 %.

20

Por consiguiente, la divulgación abarca un conjugado que comprende una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento (por ejemplo, la unidad de ligando o CBA) unida covalentemente con al menos un inhibidor de la topoisomerasa I (por ejemplo, unidad de fármaco, tal como A\* ilustrado anteriormente). Dicho inhibidor se une preferiblemente a la molécula de anticuerpo mediante un ligador (por ejemplo, unidad de ligador), tal como un ligador descrito anteriormente como  $\text{R}^{\text{L}}$  y/o  $\text{R}^{\text{LL}}$ . En otras palabras, la divulgación abarca una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento (por ejemplo, la unidad de ligando o CBA) con uno o más inhibidores de la topoisomerasa I unidos, preferiblemente por medio de un ligador (por ejemplo, unidades de fármaco-ligador). La molécula de anticuerpo (que representa una unidad de ligando o CBA), descrita con más detalle anteriormente, es un agente de direccionamiento que se une a un resto diana. Más particularmente, esta molécula de anticuerpo puede unirse, por ejemplo, específicamente a un EGFR y cMET en una célula

30

35

diana, a la que se suministra, por tanto, la unidad de fármaco. Por consiguiente, la presente divulgación también proporciona métodos para el tratamiento de, por ejemplo, diversos cánceres y otros trastornos con un ADC (por ejemplo, cánceres/trastornos que están asociados con la presencia de células, preferiblemente células cancerosas, que expresan EGFR y cMET). Dichos métodos se describen con más detalle a continuación.

Ciertas características de los inhibidores de la topoisomerasa I descritos anteriormente se prefieren particularmente y pueden definirse en más detalle tal como se expone a continuación. A modo de ejemplo, un ejemplo preferido de la característica  $Q^X$  (por ejemplo, dentro del ligador de 1a descrito anteriormente) se describirá.

Las siguientes preferencias se pueden aplicar a todos los aspectos de la divulgación tal como se han descrito anteriormente o se pueden referir a un único aspecto. Las preferencias se pueden combinar entre sí en cualquier combinación.

$Q^X$

En un ejemplo, Q es un residuo de aminoácido. El aminoácido puede ser un aminoácido natural o un aminoácido no natural. Por ejemplo, Q puede seleccionarse de: Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg y Trp, donde Cit es citrulina.

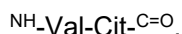
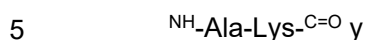
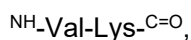
En un ejemplo, Q comprende un residuo dipeptídico. Los aminoácidos en el dipéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En algunos ejemplos, el dipéptido comprende aminoácidos naturales. Cuando el ligador es un ligador lábil por acción de la catepsina, el dipéptido es el sitio de acción para una escisión mediada por la catepsina. El dipéptido es entonces un sitio de reconocimiento para la catepsina.

En un ejemplo, Q se selecciona entre:

NH-Phe-Lys-C=O,  
 NH-Val-Ala-C=O,  
 NH-Val-Lys-C=O,  
 NH-Ala-Lys-C=O,  
 NH-Val-Cit-C=O,  
 NH-Phe-Cit-C=O,  
 NH-Leu-Cit-C=O,  
 NH-Ile-Cit-C=O,  
 NH-Phe-Arg-C=O,  
 NH-Trp-Cit-C=O y  
 NH-Gly-Val-C=O;

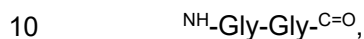
donde Cit es citrulina.

Preferentemente, Q se selecciona entre:



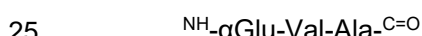
Más preferiblemente, Q se selecciona entre  $\text{NH-Phe-Lys-C=O}$ ,  $\text{NH-Val-Cit-C=O}$  o  $\text{NH-Val-Ala-C=O}$ .

Otras combinaciones de dipéptidos adecuadas incluyen:

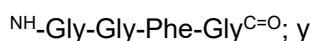


Se pueden utilizar otras combinaciones de dipéptidos, incluidas las descritas en Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869, que se incorpora a la presente por referencia.

En algunos ejemplos, Q es un residuo tripeptídico. Los aminoácidos en el tripéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En algunos ejemplos, el tripéptido comprende aminoácidos naturales. Cuando el ligador es un ligador lábil por acción de la catepsina, el tripéptido es el sitio de acción para una escisión mediada por la catepsina. El tripéptido es entonces un sitio de reconocimiento para la catepsina. Los ligadores tripeptídicos de interés particular son:



En algunos ejemplos, Q es un residuo tetrapeptídico. Los aminoácidos en el tetrapéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En algunos ejemplos, el tetrapéptido comprende aminoácidos naturales. Cuando el ligador es un ligador lábil por acción de la catepsina, el tetrapéptido es el sitio de acción para una escisión mediada por la catepsina. El tetrapéptido es entonces un sitio de reconocimiento para la catepsina. Los ligadores tetrapeptídicos de interés particular son:

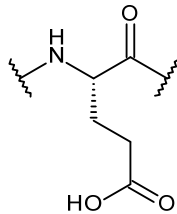


En algunos ejemplos, el tetrapéptido es:

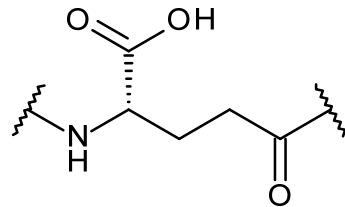


En las representaciones anteriores de residuos peptídicos,  $^{\text{NH}}$ - representa el extremo N y  $^{\text{C=O}}$  representa el extremo C del residuo. El extremo C se une al NH de A\*.

Glu representa el residuo de ácido glutámico, es decir:



$\alpha$ Glu representa el residuo de ácido glutámico cuando se une mediante la cadena  $\alpha$ , es decir:



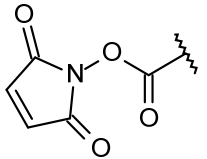
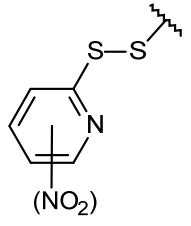
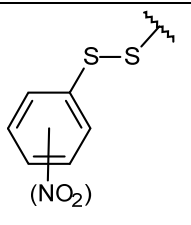
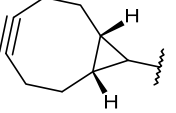
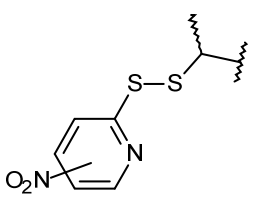
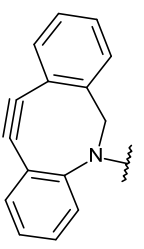
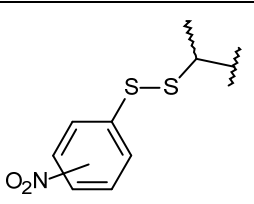
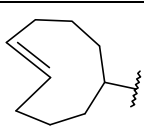
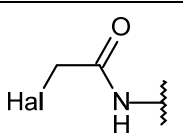
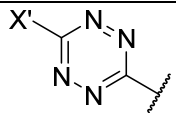
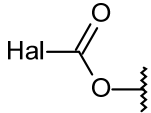
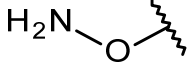
En un ejemplo, la cadena lateral del aminoácido se protege químicamente, cuando sea adecuado. El grupo protector de la cadena lateral puede ser un grupo tal como se ha discutido anteriormente. Las secuencias de aminoácidos protegidas son escindidas por enzimas. Por ejemplo, una secuencia dipeptídica que comprenda un residuo de Lys en la cadena lateral protegido con Boc puede ser escindida por la cathepsina.

Los grupos protectores para las cadenas laterales de los aminoácidos son muy conocidos en la técnica y se describen en el catálogo de Novabiochem y como se ha descrito anteriormente.

$G^L$

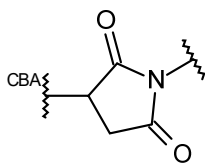
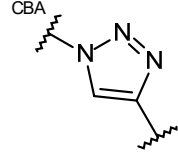
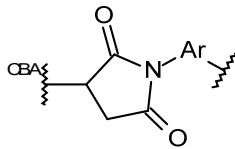
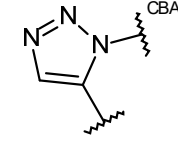
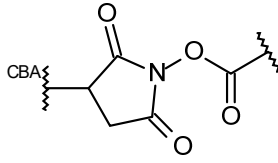
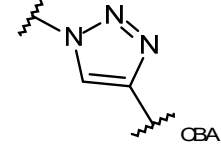
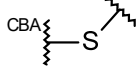
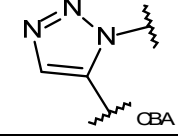
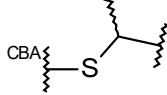
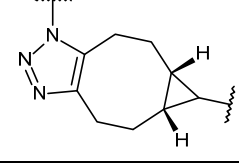
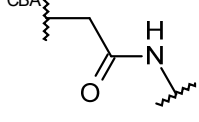
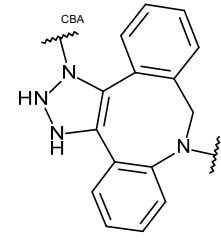
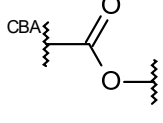
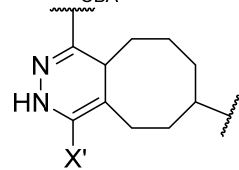
$G^L$  puede seleccionarse entre:

|                      |  |                    |  |
|----------------------|--|--------------------|--|
| (G <sup>L1-1</sup> ) |  | (G <sup>L6</sup> ) |  |
| (G <sup>L1-2</sup> ) |  | (G <sup>L7</sup> ) |  |

|    |                                            |                                                                                                          |                     |                                                                                                          |
|----|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | (G <sup>L2</sup> )                         |                         | (G <sup>L8</sup> )  |                        |
| 5  | (G <sup>L3-1</sup> )                       | <br>(NO <sub>2</sub> )  | (G <sup>L9</sup> )  |                       |
| 10 | donde el grupo NO <sub>2</sub> es opcional |                                                                                                          |                     |                                                                                                          |
| 15 | (G <sup>L3-2</sup> )                       | <br>(NO <sub>2</sub> ) | (G <sup>L10</sup> ) |                        |
| 20 | donde el grupo NO <sub>2</sub> es opcional |                                                                                                          |                     |                                                                                                          |
| 25 | (G <sup>L3-3</sup> )                       | <br>O <sub>2</sub> N  | (G <sup>L11</sup> ) |                      |
| 30 | donde el grupo NO <sub>2</sub> es opcional |                                                                                                          |                     |                                                                                                          |
| 35 | (G <sup>L3-4</sup> )                       | <br>O <sub>2</sub> N  | (G <sup>L12</sup> ) |                      |
|    | donde el grupo NO <sub>2</sub> es opcional |                                                                                                          |                     |                                                                                                          |
| 30 | (G <sup>L4</sup> )                         | <br>Hal               | (G <sup>L13</sup> ) | <br>X'               |
|    | donde Hal = I, Br, Cl                      |                                                                                                          |                     |                                                                                                          |
| 35 | (G <sup>L5</sup> )                         | <br>Hal               | (G <sup>L14</sup> ) | <br>H <sub>2</sub> N |

5

$G^{LL}$  se puede seleccionar entre:

|    |                                                                                                   |                                                                                                    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10 | $(G^{LL1-1})$    | $(G^{LL8-1})$    |
| 15 | $(G^{LL1-2})$    | $(G^{LL8-2})$    |
| 20 | $(G^{LL2})$     | $(G^{LL9-1})$   |
| 25 | $(G^{LL3-1})$  | $(G^{LL9-2})$  |
| 30 | $(G^{LL3-2})$  | $(G^{LL10})$   |
| 35 | $(G^{LL-4})$   | $(G^{LL11})$   |
|    | $(G^{LL5})$    | $(G^{LL12})$   |

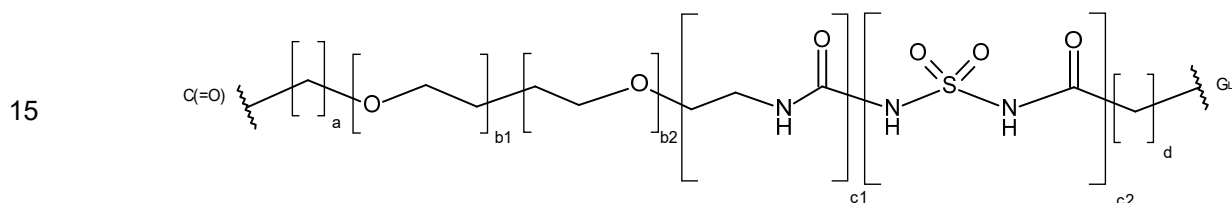
|   |                         |                          |
|---|-------------------------|--------------------------|
| 5 | (G <sup>LL6</sup> )<br> | (G <sup>LL13</sup> )<br> |
|   | (G <sup>LL7</sup> )<br> | (G <sup>LL14</sup> )<br> |

donde Ar representa un grupo arileno C<sub>5-6</sub>, por ejemplo, fenileno y X' representa alquilo C<sub>1-4</sub>. CBA representa el agente de unión celular o la unidad de ligando.

En algunos ejemplos, G<sup>LL</sup> se selecciona entre G<sup>LL1-1</sup> y G<sup>LL1-2</sup>. En algunos de estos ejemplos, G<sup>LL</sup> es G<sup>LL1-1</sup>.

X

X es preferiblemente:



donde a = de 0 a 5, b<sub>1</sub> = de 0 a 16, b<sub>2</sub> = de 0 a 16, c = 0 o 1, d = de 0 a 5, donde al menos b<sub>1</sub> o b<sub>2</sub> = 0 y al menos c<sub>1</sub> o c<sub>2</sub> = 0.

a puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunos ejemplos, a es de 0 a 3. En algunos de estos ejemplos, a es 0 o 1. En otros ejemplos, a es 0.

b<sub>1</sub> puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En algunos ejemplos, b<sub>1</sub> es de 0 a 12. En algunos de estos ejemplos, b<sub>1</sub> es de 0 a 8 y puede ser 0, 2, 3, 4, 5 u 8.

b<sub>2</sub> puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En algunos ejemplos, b<sub>2</sub> es de 0 a 12. En algunos de estos ejemplos, b<sub>2</sub> es de 0 a 8 y puede ser 0, 2, 3, 4, 5 u 8. Preferiblemente, solo uno de entre b<sub>1</sub> y b<sub>2</sub> puede no ser 0.

c<sub>1</sub> puede ser 0 o 1. c<sub>2</sub> puede ser 0 o 1. Preferiblemente, solo uno de entre c<sub>1</sub> y c<sub>2</sub> puede no ser 0.

d puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunos ejemplos, d es de 0 a 3. En algunos de estos ejemplos, d es 1 o 2. En otros ejemplos, d es 2. En otros ejemplos, d es 5.

En algunos ejemplos de X, a es 0, b<sub>1</sub> es 0, c<sub>1</sub> es 1, c<sub>2</sub> es 0 y d es 2, y b<sub>2</sub> puede ser de 0 a 8. En algunos de estos ejemplos, b<sub>2</sub> es 0, 2, 3, 4, 5 u 8. En algunos ejemplos de X, a es 1, b<sub>2</sub> es 0, c<sub>1</sub> es 0, c<sub>2</sub> es 0 y d es 0, y b<sub>1</sub> puede ser de 0 a 8. En algunos de estos ejemplos, b<sub>1</sub>

es 0, 2, 3, 4, 5 u 8. En algunos ejemplos de X, a es 0, b1 es 0, c1 es 0, c2 es 0 y d es 1, y b2 puede ser de 0 a 8. En algunos de estos ejemplos, b2 es 0, 2, 3, 4, 5 u 8. En algunos ejemplos de X, b1 es 0, b2 es 0, c1 es 0, c2 es 0 y uno de entre a y d es 0. El otro de entre a y d es de 1 a 5. En algunos de estos ejemplos, el otro de entre a y d es 1. En otros de estos ejemplos, el otro de entre a y d es 5. En algunos ejemplos de X, a es 1, b2 es 0, c1 es 0, c2 es 1, d es 2 y b1 puede ser de 0 a 8. En algunos de estos ejemplos, b2 es 0, 2, 3, 4, 5 u 8.

En algunos ejemplos,  $R^L$  es de fórmula Ib. En algunos ejemplos,  $R^{LL}$  es de fórmula Ib'.

$R^{L1}$  y  $R^{L2}$  pueden seleccionarse independientemente entre H y metilo o, junto con el átomo de carbono al cual están unidos, forman un grupo de ciclopropileno o ciclobutileno.

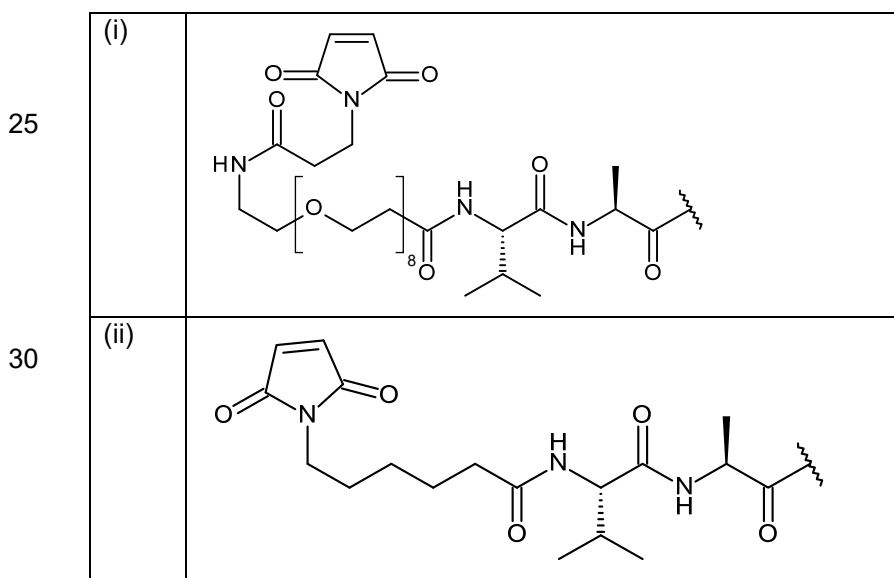
En algunos ejemplos, tanto  $R^{L1}$  como  $R^{L2}$  son H. En algunos ejemplos,  $R^{L1}$  es H y  $R^{L2}$  es metilo. En algunos ejemplos,  $R^{L1}$  y  $R^{L2}$  son ambos metilo.

En algunos ejemplos,  $R^{L1}$  y  $R^{L2}$ , junto con el átomo de carbono al cual están unidos, forman un grupo ciclopropileno. En algunos ejemplos,  $R^{L1}$  y  $R^{L2}$ , junto con el átomo de carbono al cual están unidos, forman un grupo ciclobutileno.

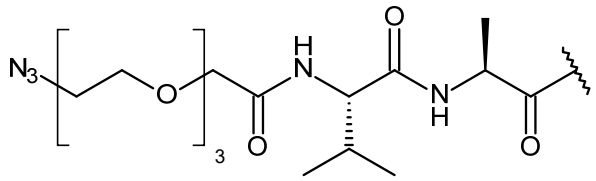
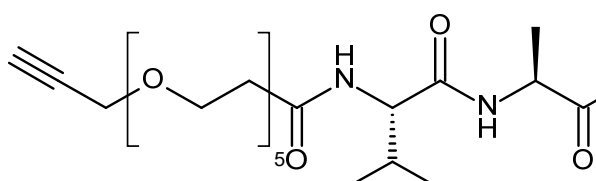
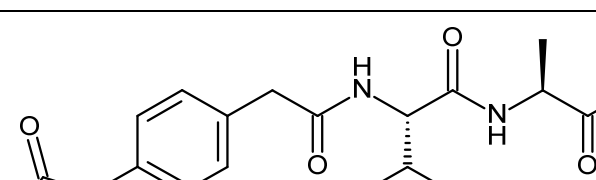
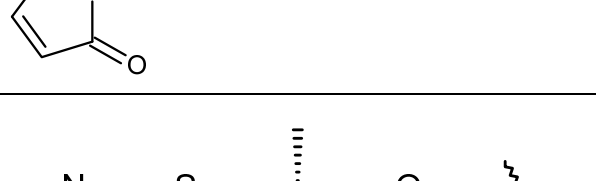
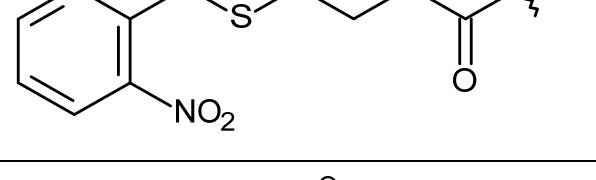
En el grupo Ib, en algunos ejemplos, e es 0. En otros ejemplos, e es 1 y el grupo nitro puede estar en cualquier posición disponible del anillo. En algunos de estos ejemplos, se encuentra en la posición orto. En otros de estos ejemplos, se encuentra en la posición para.

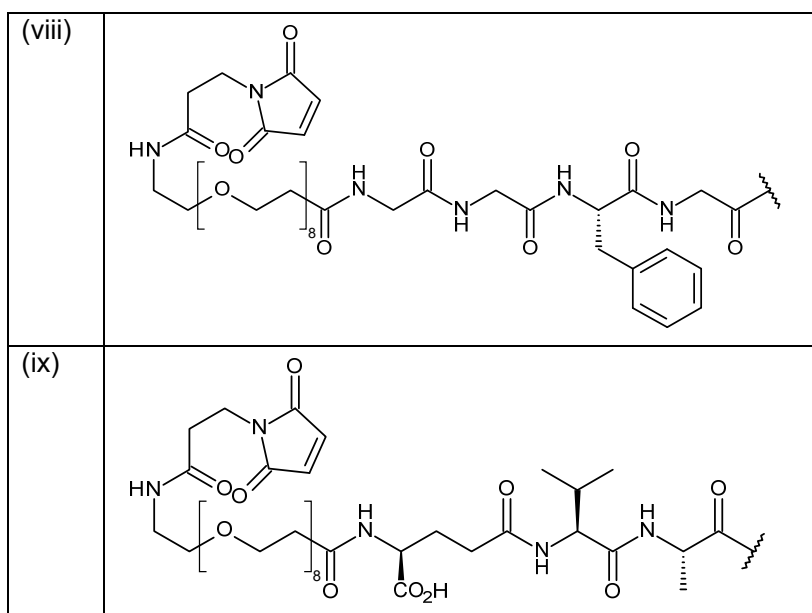
En algunos ejemplos donde los compuestos descritos en el presente documento se proporcionan en un enantiómero único o en forma enantioméricamente enriquecida, la forma enantioméricamente enriquecida tiene una relación enantiomérica mayor de 60:40, 70:30; 80:20 o 90:10. En otros ejemplos, la relación enantiomérica es superior a 95:5, 97:3 o 99:1.

En algunos ejemplos,  $R^L$  se selecciona entre:



35

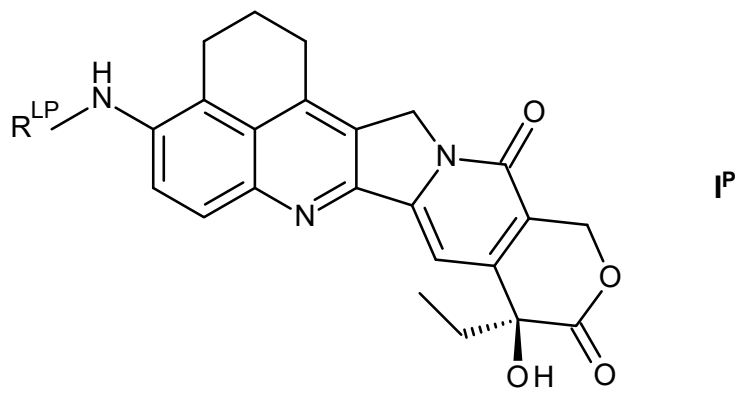
|    |       |                                                                                     |
|----|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | (iii) |    |
| 10 | (iv)  |    |
| 15 | (v)   |    |
| 20 | (vi)  |   |
| 25 | (vii) |  |
| 30 |       |                                                                                     |



En algunos ejemplos,  $R^{LL}$  es un grupo derivado de los grupos  $R^L$  anteriores.

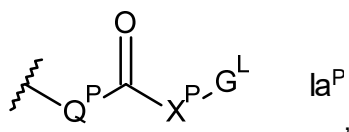
Habiendo descrito dichas preferencias anteriormente, se describen ahora ciertas fórmulas preferidas de topoisomerasa I-ligador (por ejemplo, unidad de fármaco ligador).

En algunos ejemplos, el compuesto de fórmula I es de fórmula I<sup>P</sup>:



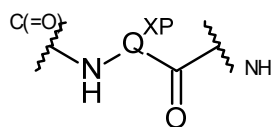
y sales y solvatos del mismo, donde  $R^{LP}$  es un ligador para la conexión con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este descrito en el presente documento, donde dicho ligador se selecciona de:

(ia):



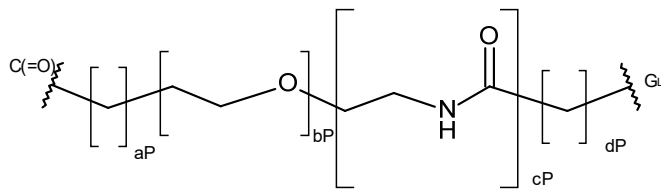
en donde

$Q^P$  es:



, donde  $Q^{XP}$  es tal que  $Q^P$  es un residuo aminoacídico, un residuo dipeptídico o un residuo tripeptídico;

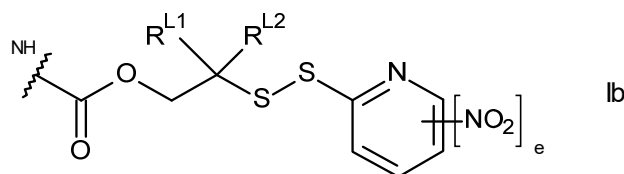
$X^P$  es:



donde  $aP$  = de 0 a 5,  $bP$  = de 0 a 16,  $cP$  = 0 o 1,  $dP$  = de 0 a 5;

$GL$  es un ligador para conectar con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este descrito en el presente documento (por ejemplo, unidad de ligando);

(ib):



donde  $R^{L1}$  y  $R^{L2}$  se seleccionan independientemente entre H y metilo o, junto con el átomo de carbono al cual están unidos, forman un grupo de ciclopropileno o ciclobutileno; y

$e$  es 0 o 1.

$aP$  puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunos ejemplos,  $aP$  es de 0 a 3. En algunos de estos ejemplos,  $aP$  es 0 o 1. En otros ejemplos,  $aP$  es 0.

$bP$  puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En algunos ejemplos,  $b$  es de 0 a 12. En algunos de estos ejemplos,  $bP$  es de 0 a 8 y puede ser 0, 2, 4 u 8.

$cP$  puede ser 0 o 1.

$dP$  puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunos ejemplos,  $dP$  es de 0 a 3. En algunos de estos ejemplos,  $dP$  es 1 o 2. En otros ejemplos,  $dP$  es 2.

En algunos ejemplos de  $X^P$ ,  $aP$  es 0,  $cP$  es 1 y  $dP$  es 2, y  $bP$  puede ser de 0 a 8. En algunos de estos ejemplos,  $bP$  es 0, 4 u 8.

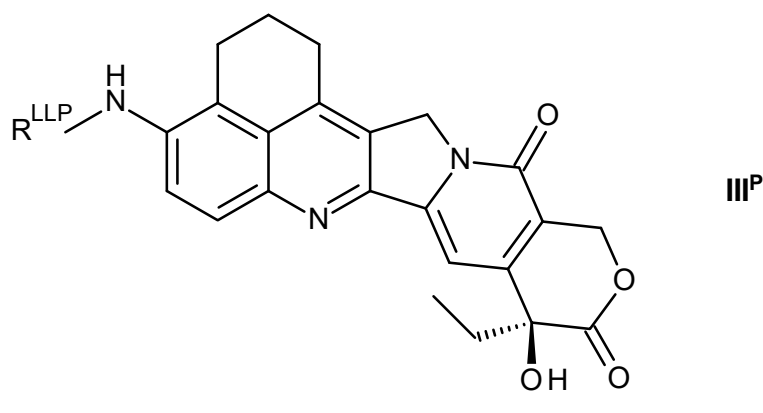
Las preferencias para  $Q^X$  anteriores para compuestos de Fórmula I se pueden aplicar a  $Q^{XP}$  (por ejemplo, cuando sea adecuado).

Las preferencias para  $G^L$ ,  $R^{L1}$ ,  $R^{L2}$  y e anteriores para compuestos de Fórmula I se pueden aplicar a compuestos de Fórmula I<sup>P</sup>.

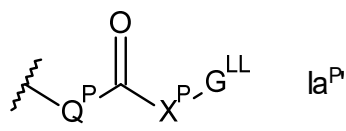
En algunos ejemplos, el conjugado de fórmula IV es de fórmula IV<sup>P</sup>:



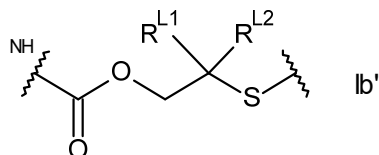
o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde L es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este descrito en el presente documento (por ejemplo, unidad de ligando),  $D^{LP}$  es un inhibidor de la topoisomerasa I (por ejemplo, unidad de fármaco ligador) que es de fórmula III<sup>P</sup>:



$R^{LLP}$  es un ligador conectado con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este (por ejemplo, unidad de ligando), donde dicho ligador se selecciona de (ia'):

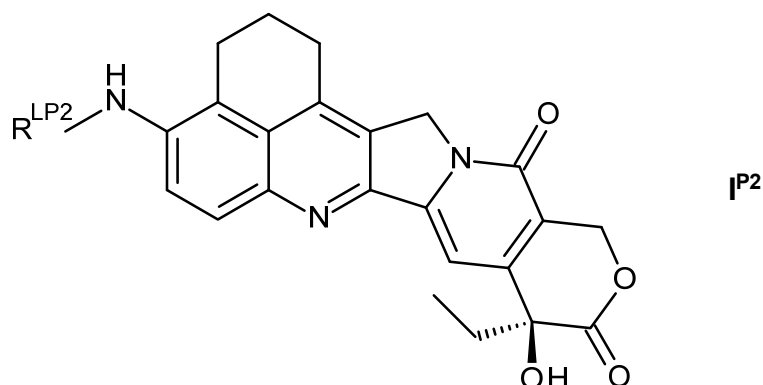


donde  $Q^P$  y  $X^P$  son como se han definido anteriormente y  $G^{LL}$  es un ligador conectado con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este descrito en el presente documento (por ejemplo, unidad de ligando); y (ib'):



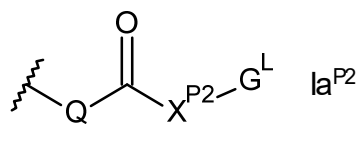
donde  $R^{L1}$  y  $R^{L2}$  son como se han definido anteriormente; y p es un número entero de 1 a 20.

En algunos ejemplos, el compuesto de fórmula I es de fórmula I<sup>P2</sup>:



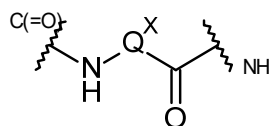
y sales y solvatos del mismo, donde  $R^{LP2}$  es un ligador para la conexión con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este descrito en el presente documento, donde dicho ligador se selecciona de:

(ia):



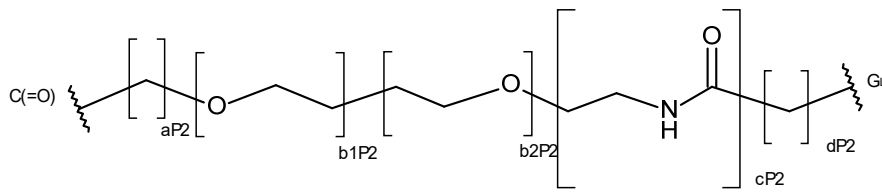
en donde

Q es:



, donde  $Q^X$  es tal que Q es un residuo aminoácido, un residuo dipeptídico, un residuo tripeptídico o un residuo tetrapeptídico;

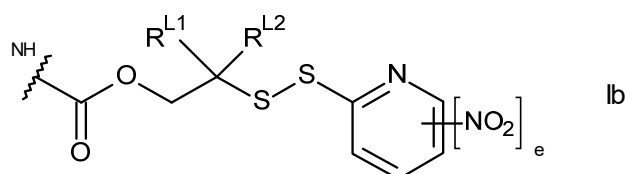
$X^{P2}$  es:



donde  $aP2$  = de 0 a 5,  $b1P2$  = de 0 a 16,  $b2P2$  = de 0 a 16,  $cP2$  = 0 o 1,  $dP2$  = de 0 a 5, donde al menos  $b1P2$  o  $b2P2$  = 0 (es decir, solo uno de entre  $b1$  y  $b2$  puede no ser 0);

$G^L$  es un ligador para conectar con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este descrito en el presente documento (por ejemplo, unidad de ligando);

(ib):



5

donde  $R^{L1}$  y  $R^{L2}$  se seleccionan independientemente entre H y metilo o, junto con el átomo de carbono al cual están unidos, forman un grupo de ciclopropileno o ciclobutileno; y e es 0 o 1.

aP2 puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunos ejemplos, aP2 es de 0 a 3. En algunos de estos ejemplos, aP2 es 0 o 1. En otros ejemplos, aP2 es 0.

b1P2 puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En algunos ejemplos, b1P2 es de 0 a 12. En algunos de estos ejemplos, b1P2 es de 0 a 8 y puede ser 0, 2, 3, 4, 5 u 8.

b2P2 puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En algunos ejemplos, b2P2 es de 0 a 12. En algunos de estos ejemplos, b2P2 es de 0 a 8 y puede ser 0, 2, 3, 4, 5 u 8.

Preferiblemente, solo uno de entre b1P2 y b2P2 puede no ser 0.

cP2 puede ser 0 o 1.

dP2 puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunos ejemplos, dP2 es de 0 a 3. En algunos de estos ejemplos, dP2 es 1 o 2. En otros ejemplos, dP2 es 2. En otros ejemplos, dP2 es 5.

En algunos ejemplos de  $X^{P2}$ , aP2 es 0, b1P2 es 0, cP2 es 1 y dP2 es 2, y b2P2 puede ser de 0 a 8. En algunos de estos ejemplos, b2P2 es 0, 2, 3, 4, 5 u 8. En algunos ejemplos de  $X^{P2}$ , aP2 es 1, b2P2 es 0, cP2 es 0 y dP2 es 0, y b1P2 puede ser de 0 a 8. En algunos de estos ejemplos, b1P2 es 0, 2, 3, 4, 5 u 8. En algunos ejemplos de  $X^{P2}$ , aP2 es 0, b1P2 es 0, cP2 es 0 y dP2 es 1, y b2P2 puede ser de 0 a 8. En algunos de estos ejemplos, b2P2 es 0, 2, 3, 4, 5 u 8. En algunos ejemplos de  $X^{P2}$ , b1P2 es 0, b2P2 es 0, cP2 es 0 y uno de entre aP2 y dP2 es 0. El otro de entre aP2 y d es de 1 a 5. En algunos de estos ejemplos, el otro de entre aP2 y d es 1. En otros de estos ejemplos, el otro de entre aP2 y dP2 es 5.

Las preferencias para  $Q^X$  anteriores para compuestos de Fórmula I se pueden aplicar a  $Q^X$  en la Fórmula Ia<sup>P2</sup> (por ejemplo, cuando sea adecuado).

Las preferencias para  $G^L$ ,  $R^{L1}$ ,  $R^{L2}$  y e anteriores para compuestos de Fórmula I se pueden aplicar a compuestos de Fórmula IP<sup>2</sup>.

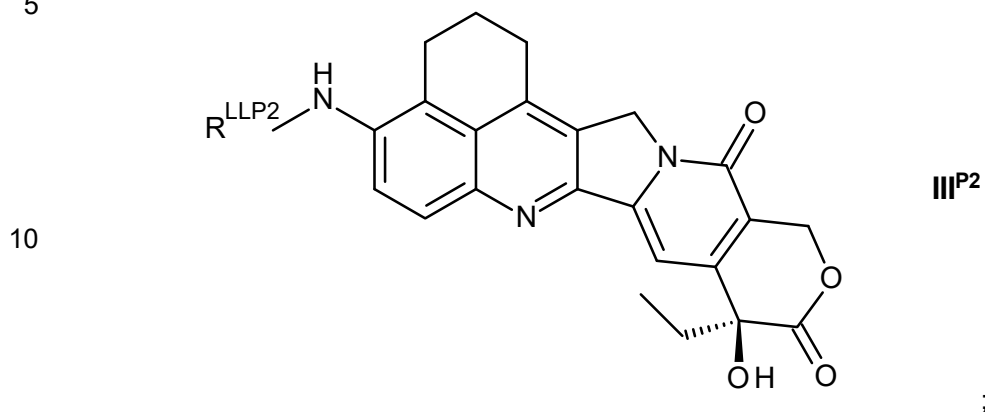
En algunos ejemplos, el conjugado de fórmula IV es de fórmula IV<sup>P2</sup>:



35

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, donde L es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este descrito en el presente documento (por ejemplo, unidad de ligando),  $D^{LP2}$  es un inhibidor de la topoisomerasa I (por ejemplo, unidad de fármaco ligador) que es de fórmula III<sup>P2</sup>:

5

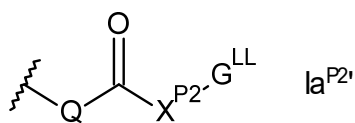


10

15

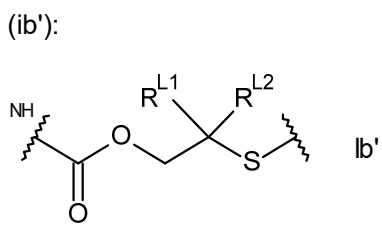
$R^{LLP2}$  es un ligador conectado con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este (por ejemplo, unidad de ligando), donde dicho ligador se selecciona de (ia'):

20



donde Q y  $X^{P2}$  son como se han definido anteriormente y  $G^{LL}$  es un ligador conectado con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este descrito en el presente documento; y

25

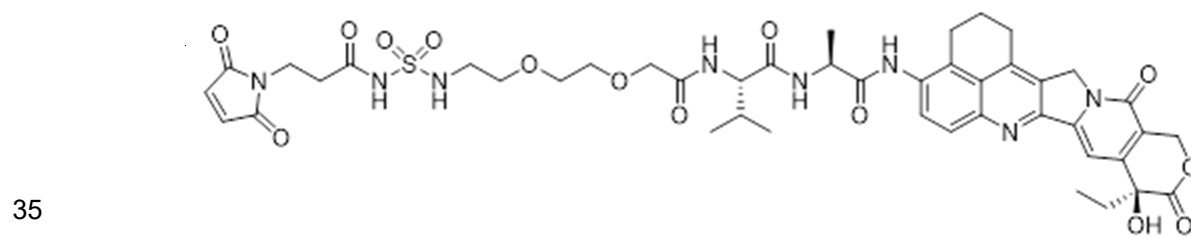
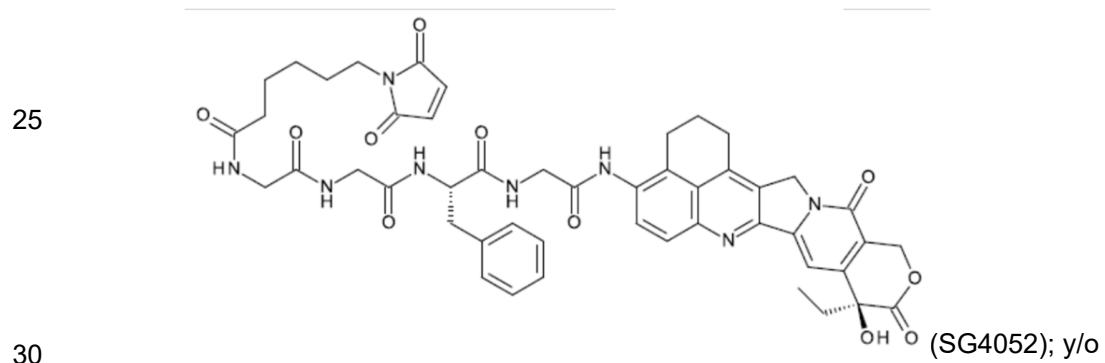
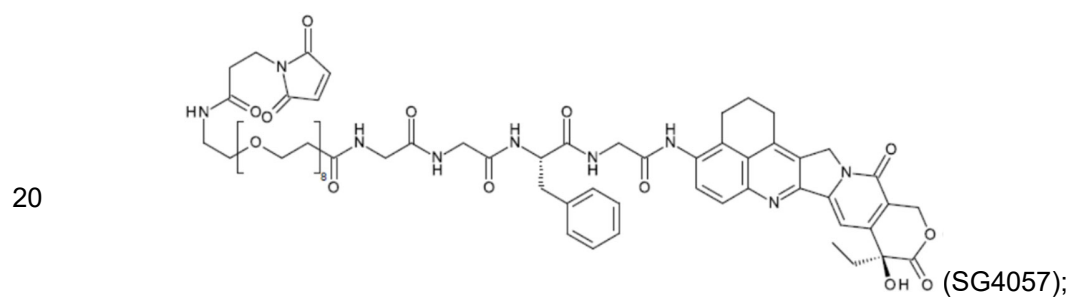
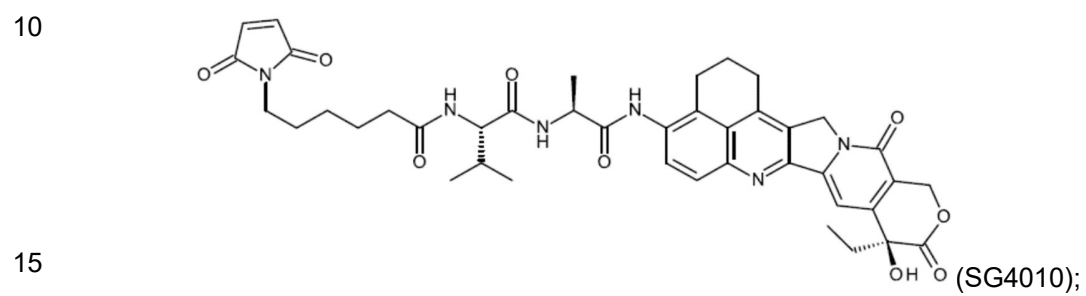
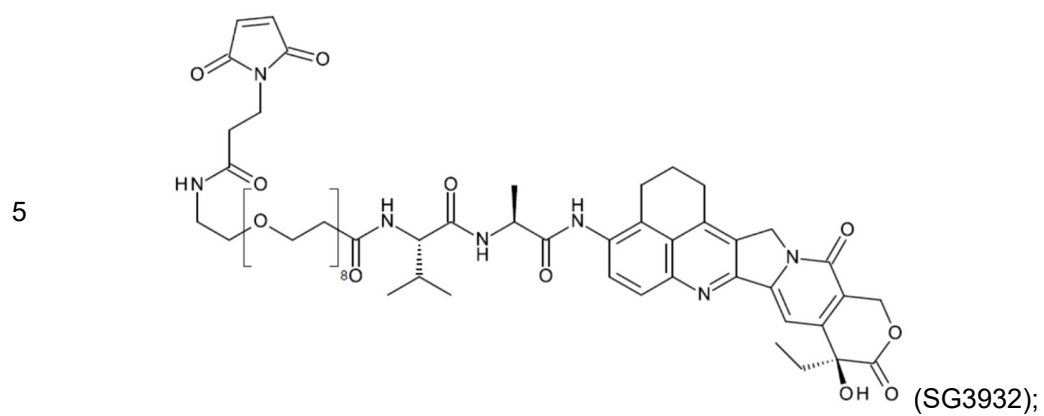


30

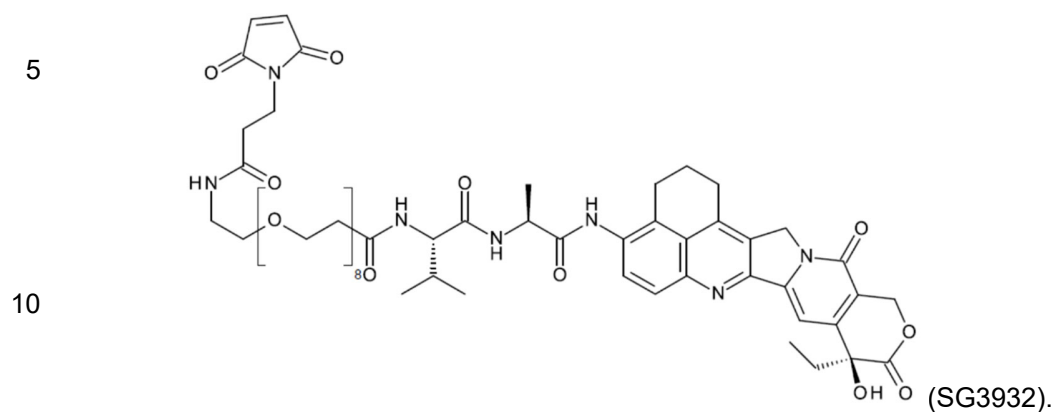
donde  $R^{L1}$  y  $R^{L2}$  son como se han definido anteriormente; y p es un número entero de 1 a 20.

Los inhibidores de la topoisomerasa I particularmente adecuados incluyen aquellos que tienen las siguientes fórmulas:

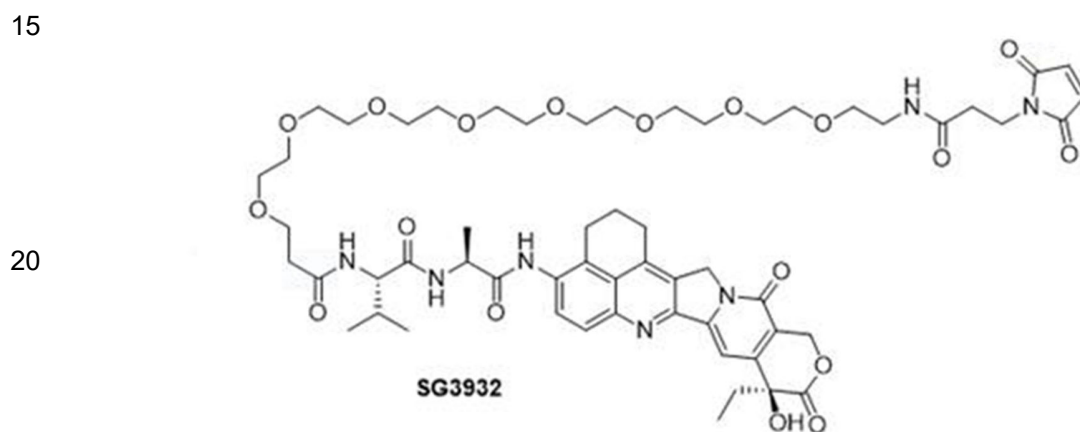
35



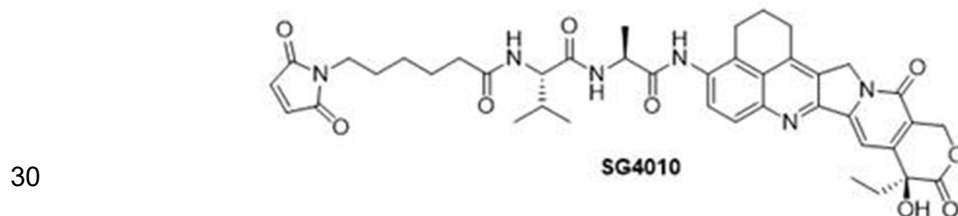
SG3932 se prefiere particularmente. Por lo tanto, en un ejemplo preferido, una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento se conjuga con un inhibidor de la topoisomerasa I que tiene la siguiente fórmula (p. ej., SG3932):



Para evitar la duda, el número '8' especifica que la estructura dentro de corchetes se repite ocho veces. Por tanto, otra representación de SG3932 es:

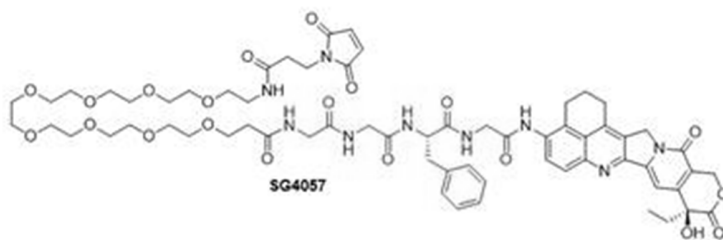


25 Otra representación de SG4010 es:

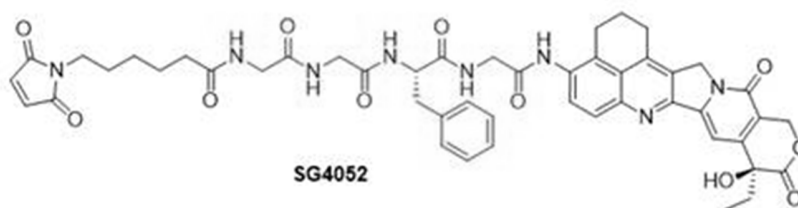


Otra representación de SG4057 es:

35



Otra representación de SG4052 es:

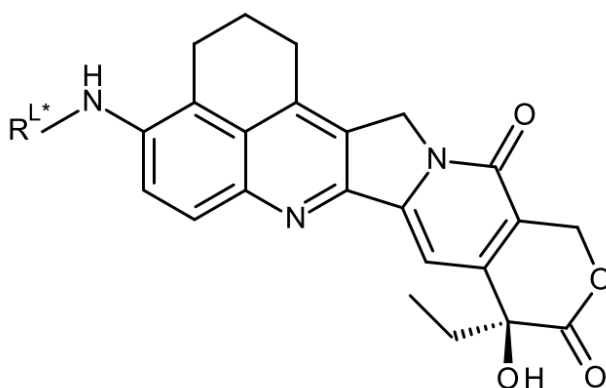


Cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este descrito en el presente documento puede conjugarse a uno o más de dicho inhibidor(es) de la topoisomerasa I.

### **Síntesis de inhibidores de la topoisomerasa I**

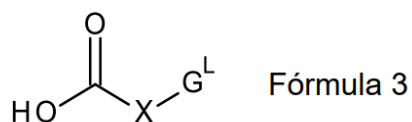
Para completar, se describirán ahora ciertas rutas sintéticas generales para la preparación de inhibidor(es) de la topoisomerasa I preferido(s).

Los compuestos de fórmula I donde  $R^L$  es de fórmula la se pueden sintetizar a partir de un compuesto de Fórmula 2:



Fórmula 2

donde  $R^{L*}$  es  $-QH$  enlazando un compuesto de Fórmula 3:



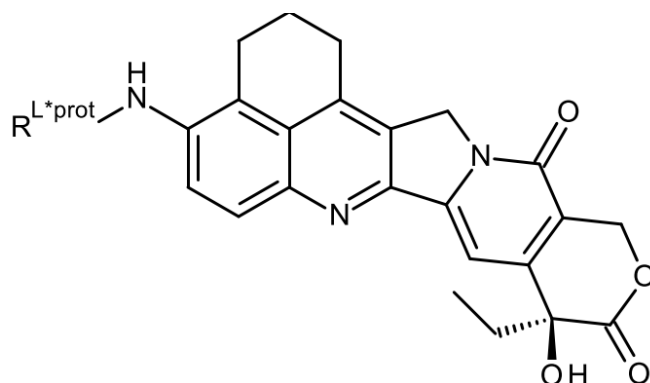
Fórmula 3

o una versión activada de este.

Una reacción de este tipo se puede llevar a cabo en condiciones de acoplamiento de amidas.

Los compuestos de Fórmula 2 se pueden sintetizar mediante la desprotección de un compuesto de Fórmula 4:

5



Fórmula 4

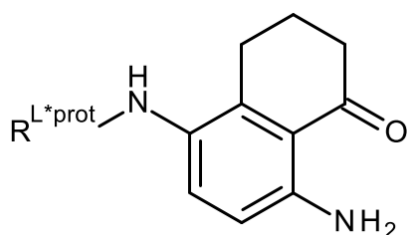
10

donde  $R^{L*prot}$  es  $-Q-Prot^N$ , donde  $Prot^N$  es un grupo protector de aminas.

15

Los compuestos de Fórmula 4 se pueden sintetizar mediante el acoplamiento de un compuesto de Fórmula 5:

20



Fórmula 5

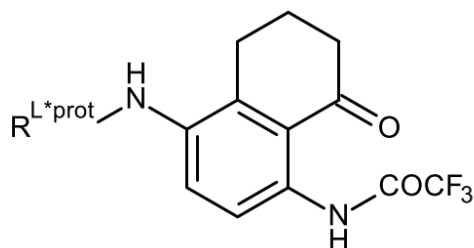
;

con el compuesto A3 utilizando la reacción de Friedlander.

Los compuestos de Fórmula 5 se pueden sintetizar a partir de compuestos de Fórmula

25

6:



Fórmula 6

;

mediante la eliminación del grupo protector de tipo trifluoroacetamida.

Los compuestos de Fórmula 6 se pueden sintetizar mediante el acoplamiento de:  $R^{L*prot}-OH$  con el compuesto 17.

35

Los compuestos de fórmula I donde  $R^L$  es de fórmula Ia o Ib se pueden sintetizar a partir del compuesto I11 mediante el acoplamiento del compuesto  $R^L$ -OH o una forma activada de este.

#### Grupos protectores de aminas:

- 5 Los grupos protectores de aminas son muy conocidos por los expertos en la técnica. Se hace referencia particular a la divulgación de grupos protectores adecuados en *Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis*, cuarta edición, John Wiley & Sons, 2007 (ISBN 978-0-471-69754-1), páginas 696-871.

- 10 La carga de fármaco (p) es el número promedio de fármacos (p. ej., tubulisina o inhibidor de la topoisomerasa) por molécula de anticuerpo. En las composiciones de la divulgación, la carga de fármaco oscila entre 1 y 20 fármacos (D) por molécula de anticuerpo. Por ejemplo, la carga de fármaco puede oscilar de 1 a 10 fármacos (D) por molécula de anticuerpo, es decir, donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 fármacos están unidos covalentemente a la molécula de anticuerpo. Las composiciones de conjugados incluyen colecciones de
- 15 moléculas de anticuerpo, conjugadas con un intervalo de fármacos, de 1 a 10. Cuando los compuestos de la divulgación se unen a lisinas, la carga de fármaco puede oscilar entre 1 y 80 fármacos (D) por molécula de anticuerpo, aunque puede preferirse un límite superior de 40, 20, 10 u 8. Las composiciones de conjugados incluyen colecciones de moléculas de anticuerpo, conjugadas con un intervalo de fármacos, de 1 a 80, de 1 a 40, de 1 a 20, de 1 a
- 20 10 o de 1 a 8.

- El número promedio de fármacos por anticuerpo en los preparados de conjugados procedentes de reacciones de conjugación se puede caracterizar utilizando métodos convencionales tales como UV, HPLC de fase inversa, HIC, espectrometría de masas, un ensayo ELISA y electroforesis. También se puede determinar la distribución cuantitativa de
- 25 conjugados en lo que se refiere a p. Mediante ELISA se puede determinar el valor promedio de p en un determinado preparado de conjugados (Hamblett, 2004; Sanderson, 2005). Sin embargo, la distribución de los valores de p (fármaco) no se puede discernir mediante la unión de anticuerpo-antígeno y la limitación de la detección de ELISA. Además, el ensayo ELISA para la detección de conjugados no determina si los restos del fármaco están unidos a la
- 30 molécula de anticuerpo, tal como fragmentos de la cadena ligera o la cadena pesada, o a los residuos aminoacídicos particulares. En algunos ejemplos, se puede conseguir la separación, purificación y caracterización de un conjugado homogéneo donde p tiene un valor determinado de un conjugado con otras cargas de fármaco utilizando medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis. Tales técnicas también se pueden aplicar a otros tipos de conjugados.

Para algunos conjugados, el valor de p se puede ver limitado por el número de sitios de unión en la molécula de anticuerpo. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo puede tener solo un grupo tiol de cisteína o varios, o puede tener solo un grupo tiol suficientemente reactivo o varios mediante los cuales se pueda unir un ligador.

5 Habitualmente, durante una reacción de conjugación se conjugan menos del máximo teórico de fármaco a una molécula de anticuerpo. Una molécula de anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos residuos de lisina que no reaccionen con el ligador (L). Quizás solo los grupos de lisina más reactivos reaccionarán con un reactivo ligador que reaccione con aminas. Además, quizás solo los grupos tiol de la cisteína más reactivos reaccionarán con un  
10 reactivo ligador que reaccione con el tiol. Por lo general, las moléculas de anticuerpo no contienen muchos, en el caso de que los contengan, grupos tiol de cisteína libres y reactivos que se puedan enlazar a un resto del fármaco. La mayoría de los residuos de tiol de la cisteína en las moléculas de anticuerpo de los conjugados existen como puentes de disulfuro y se deben reducir con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o TCEP, en condiciones de  
15 reducción total o parcial. La carga (relación de fármaco/anticuerpo) de un conjugado puede controlarse de varias maneras diferentes, que incluyen: (i) limitar el exceso molar de fármaco ligador respecto al anticuerpo, (ii) limitar el tiempo o la temperatura de la reacción de conjugación o (iii) limitar las condiciones reductoras o aplicar unas condiciones reductoras parciales para la modificación del tiol de la cisteína.

20 Ciertas moléculas de anticuerpo tienen disulfuros entre las cadenas, es decir, puentes de cisteína que pueden reducirse. Las moléculas de anticuerpo pueden volverse reactivos para la conjugación con reactivos ligadores mediante el tratamiento con un agente reductor tal como DTT (dithionite). Cada puente de cisteína formará de este modo, en teoría, dos nucleófilos de tipo tiol reactivos. Este proceso también se denomina "conjugación clásica" y se  
25 distingue de métodos en los que la conjugación tiene lugar en una cisteína que se ha modificado mediante ingeniería en un sitio específico de la molécula de anticuerpo. Se pueden introducir grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminothiolano (reactivo de Traut) que da como resultado la conversión de una amina en un tiol.

30 Se preparan los ADC con fármacos conjugados aleatoriamente con residuos de cisteína nativos mediante conjugación clásica por reducción parcial del anticuerpo, seguido de la reacción con el ligador-fármaco deseado. Por ejemplo, el anticuerpo a una concentración de 5 mg/ml se reduce parcialmente mediante la adición de aproximadamente 3 equivalentes molares de DTT a pH 8.0, seguido de incubación a aproximadamente 37 °C durante  
35 aproximadamente 2 horas. Después, la reacción de reducción puede enfriarse en hielo y el

exceso de DTT puede eliminarse, por ejemplo, mediante diafiltración. Después, puede añadirse el ligador-fármaco a una relación molar de ligador-fármaco/tiol de aproximadamente 1:10. La reacción de conjugación puede llevarse a cabo en presencia de ~10 % v/v de DMSO. Después de la conjugación, puede añadirse cisteína libre en exceso (una relación molar de  
5 aproximadamente 2 veces con respecto al ligador-fármaco) para inactivar el ligador-fármaco que no ha reaccionado, para producir el aducto de cisteína-ligador-fármaco. La mezcla de reacción puede purificarse entonces (por ejemplo, mediante cromatografía de interacción hidrófoba) y puede someterse a intercambio de tampón en PBS. Puede determinarse la distribución de carga del fármaco utilizando métodos convencionales, tales como  
10 cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de fase inversa reducida, tal como se describe en otra parte.

Se conocen métodos para preparar conjugados usando conjugación directa en tioles accesibles por disolventes generados por reducción de los puentes disulfuro entre cadenas de moléculas de anticuerpo que involucran *N*-alquil maleimida. Otros métodos conjugan el  
15 fármaco en aminas primarias de lisinas utilizando éster de *N*-hidroxisuccinimida. Dichos métodos se revisan, por ejemplo, en Gébleux y Casi, *Pharmacol Ther* (2016) 167: 48-59, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

Por separado o además de los métodos de conjugación clásicos descritos anteriormente, también es posible usar la conjugación específica del sitio, un método en el que  
20 se controla la carga de fármaco y el sitio de conjugación. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante modificación por ingeniería de cisteínas en residuos específicos, el reemplazo de residuos por aminoácidos no naturales con reactividad bioortogonal o enfoques de ligación enzimática. Un método de conjugación específica del sitio se describe en Dimasi, 2017, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad e implica insertar  
25 cisteínas en moléculas de anticuerpo en posiciones particulares.

Los aminoácidos cisteína pueden modificarse por ingeniería en sitios reactivos en una molécula de anticuerpo y que no forman enlaces disulfuro intracatenarios o intermoleculares (Junutula, 2008; Dornan, 2009; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249). Los tioles de cisteína modificados por ingeniería pueden reaccionar con ligadores o el fármaco-ligador  
30 descrito en el presente documento que tiene grupos electrofílicos reactivos con tiol tales como maleimida o alfa-haloamidas para formar conjugados con moléculas de anticuerpo modificadas por ingeniería con cisteína y el fármaco. De este modo, la ubicación del fármaco puede diseñarse, controlarse y conocerse. La carga de fármaco se puede controlar ya que los grupos tiol de cisteínas modificadas por ingeniería normalmente reaccionan con reactivos de  
35 ligador reactivo con tiol o reactivos de fármaco-ligador con un rendimiento elevado. La

modificación de un anticuerpo IgG para introducir un aminoácido de cisteína mediante la sustitución en un único sitio de la cadena ligera o pesada proporciona dos cisteínas nuevas en el anticuerpo simétrico. Si se requiere, una carga de fármaco cercana a 2 se puede conseguir con la casi homogeneidad del producto de conjugación.

5 En algunos casos, la molécula de anticuerpo del conjugado de la divulgación comprende una región CH y el fármaco se conjuga químicamente en un aminoácido cisteína insertado entre las posiciones 239 y 240 de la región CH. en donde la numeración de la región constante es según el índice EU. Por lo tanto, la conexión entre la molécula de anticuerpo y el fármaco puede ser a través de este aminoácido cisteína insertado y un grupo maleimida  
10 terminal en el ligador.

Ejemplos de regiones CH que comprenden un aminoácido cisteína insertado entre las posiciones 239 y 240 de la región CH son SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 45. Ejemplos de cadenas pesadas que comprenden una región CH que comprende un aminoácido cisteína insertado entre las posiciones 239 y 240 de la región CH son SEQ ID NO: 50, 53 y 56.

15 En otros ejemplos, la molécula de anticuerpo del conjugado no comprende ningún residuo de aminoácido insertado en la región CH. En casos particulares, la molécula de anticuerpo del conjugado no comprende un aminoácido cisteína insertado en la región CH (por ejemplo, entre las posiciones 239 y 240, en donde la numeración de la región constante es según el índice EU). Como se demuestra en los ejemplos (por ejemplo, el Ejemplo 12), donde  
20 se usa la conjugación clásica para conjugar el fármaco-ligador con cisteínas nativas, la cisteína insertada no es necesaria.

Ejemplos de regiones CH que no comprenden ningún residuo de aminoácido insertado en la región CH son SEQ ID NO: 44, 46, 63 y 64. Ejemplos de cadenas pesadas que comprenden una región CH que no comprenden ningún residuo de aminoácido insertado en la  
25 región CH son SEQ ID NO: 51, 54, 57, 59 y 60.

Cuando más de un grupo nucleófilo o electrófilo de la molécula de anticuerpo reacciona con un producto intermedio de fármaco-ligador, un reactivo de ligador seguido de reactivo de fármaco, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos conjugados con una distribución de fármaco unido a un anticuerpo, por ejemplo, 1, 2, 3, etc.  
30 Los métodos de cromatografía líquida, tales como de fase inversa polimérica (PLRP) y de interacción hidrófoba (HIC), pueden separar compuestos en la mezcla según el valor de la carga de fármaco. Se pueden aislar preparados de conjugado con un único valor de la carga de fármaco (p), sin embargo, estos conjugados con un único valor de la carga de fármaco pueden seguir siendo mezclas heterogéneas debido a que el fármaco puede estar unido,  
35 mediante el ligador, a diferentes sitios en la molécula de anticuerpo.

Por lo tanto, las composiciones de conjugado de la divulgación incluyen mezclas de compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco donde el anticuerpo tiene uno o más restos de fármaco (p. ej., tubulisina o inhibidor de la topoisomerasa) y donde los restos de fármaco se pueden unir a la molécula de anticuerpo en diversos residuos de aminoácidos.

5 En algunos ejemplos, el número promedio de restos de fármaco de tubulisina por molécula de anticuerpo está en el intervalo de 1 a 8. En algunos ejemplos, el intervalo se selecciona de 1 a 6, de 1 a 4, de 1 a 3, preferiblemente de 1 a 2, más preferiblemente de 1.5 a 2, aún más preferiblemente de 1.8 a 2, todavía más preferiblemente de 1.9 a 2.

10 Como ya se ha descrito anteriormente, en algunos ejemplos la molécula de anticuerpo del ADC puede comprender una o más mutaciones en la(s) región (regiones) CH de la(s) cadena(s) pesada(s) para reducir o anular la unión de la molécula de anticuerpo a uno o más receptores Fcγ. Por lo tanto, la primera y/o la segunda cadena pesada de los ADC descritos en el presente documento pueden comprender fenilalanina (F) en la posición 234, ácido glutámico (E) en la posición 235 y serina (S) en la posición 331, en donde la numeración es  
15 según el índice EU.

#### Propiedades funcionales de las moléculas de anticuerpo y conjugados

Las moléculas de anticuerpo y los conjugados descritos en el presente documento pueden caracterizarse por referencia a ciertas propiedades funcionales.

##### *Afinidad de unión*

20 Las moléculas de anticuerpo y los conjugados descritos en el presente documento pueden caracterizarse por el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR que tiene una afinidad particular por EGFR y/o el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met que tiene una afinidad particular por c-Met. La afinidad de unión de una molécula de anticuerpo o conjugado a un antígeno afín, como EGFR o c-Met humano, de ratón o de macaco  
25 cynomolgus, puede determinarse mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), usando Biacore, por ejemplo. La afinidad de unión se puede determinar usando una molécula de anticuerpo, por ejemplo, como parte de una molécula de anticuerpo biespecífica que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a EGFR y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a c-Met. Como alternativa, la afinidad de unión se puede  
30 determinar usando una molécula de anticuerpo que sea monoespecífica para EGFR o c-Met. En algunos ejemplos, la afinidad de unión se determina usando BIACore como se describe en el Ejemplo 2.1.

La afinidad de unión normalmente se mide por K<sub>d</sub> (la constante de disociación de equilibrio entre el dominio de unión a antígeno y su antígeno). Como bien se entiende, cuanto  
35 menor sea el valor de K<sub>d</sub>, mayor será la afinidad de unión del dominio de unión a antígeno.

Por ejemplo, un dominio de unión a antígeno que se une a una diana con una  $K_d$  de 10 nM se consideraría que se une a dicha diana con mayor afinidad que un dominio de unión a antígeno que se une a la misma diana con una  $K_d$  de 100 nM.

La referencia a EGFR humano puede referirse a un polipéptido que comprende el dominio extracelular de EGFR, como uno que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 68. La referencia a EGFR de ratón puede referirse a un polipéptido producido a partir de la molécula disponible en SinoBiological con el número de catálogo 51091-M08H. La referencia a EGFR de macaco cynomolgus puede referirse a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 69. La referencia a c-Met humano puede referirse a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 70. La referencia a c-Met de ratón puede referirse a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 90 o al polipéptido producido a partir de la molécula disponible de SinoBiological con número de catálogo 50622-M08H. La referencia a c-Met de macaco cynomolgus puede referirse a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 71.

#### 15 *Afinidad de EGFR*

Las moléculas de anticuerpo y los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender un dominio de unión a antígeno que se une a EGFR con una baja afinidad. Se sabe que EGFR se expresa en niveles bajos en tejidos normales, por ejemplo la piel. Se espera ventajosamente que las moléculas de anticuerpo y los conjugados que se unen a EGFR con una baja afinidad muestren una toxicidad reducida en la diana en tejidos normales mientras aún pueden dirigirse a tumores que expresan altos niveles de EGFR, lo que da como resultado un perfil de seguridad mejorado. Además, como se demuestra en el presente documento, los conjugados que comprenden este dominio de unión a antígeno EGFR de baja afinidad son más eficaces para tratar el cáncer en comparación con los conjugados que comprenden un dominio de unión a antígeno EGFR de mayor afinidad.

El dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR humano con una afinidad que tiene una  $K_d$  igual o superior a 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 35 nM o 40 nM. Alternativamente, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR humano con una  $K_d$  de entre 10 y 100 nM, entre 20 y 100 nM, entre 30 y 100 nM, entre 40 y 100 nM, entre 10 y 80 nM, entre 20 y 80 nM, entre 30 y 80 nM, entre 40 y 80 nM, entre 10 y 70 nM, entre 20 y 70 nM, entre 30 y 70 nM, entre 40 y 70 nM, entre 10 y 60 nM, entre 20 y 60 nM, entre 30 y 60 nM, entre 40 y 60 nM, entre 10 y 50 nM, entre 20 y 50 nM, entre 30 y 50 nM, o entre 40 y 50 nM.

El dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR humano con una afinidad que es menor que la afinidad de un dominio de unión a antígeno que comprende

la secuencia de la cadena pesada y la secuencia de la cadena ligera de la molécula de anticuerpo QD6 expuestas en SEQ ID NO: 53 y 55, respectivamente.

Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR humano con una afinidad que tiene una Kd que es al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces o 7 veces mayor que la Kd de un dominio de unión a antígeno que comprende la secuencia de la cadena pesada y la secuencia de la cadena ligera de la molécula de anticuerpo QD6 expuestas en SEQ ID NO: 53 y 55, respectivamente, se une al EGFR humano. Alternativamente, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR humano con una afinidad que tiene una Kd que es entre 2 y 10 veces mayor, entre 3 y 10 veces mayor, entre 4 y 10 veces mayor, entre 5 y 10 veces mayor, entre 6 y 10 veces mayor, entre 7 y 10 veces mayor, entre 2 y 9 veces mayor, entre 3 y 9 veces mayor, entre 4 y 9 veces mayor, entre 5 y 9 veces mayor, entre 6 y 9 veces mayor, entre 7 y 9 veces mayor, entre 2 y 8 veces mayor, entre 3 y 8 veces mayor, entre 4 y 8 veces mayor, entre 5 y 8 veces mayor, entre 6 y 8 veces mayor, entre 7 y 8 veces mayor que la Kd de un dominio de unión a antígeno que comprende la secuencia de cadena pesada y secuencia de la cadena ligera del anticuerpo QD6 expuestas en SEQ ID NO: 53 y 55, respectivamente, se une al EGFR humano.

El dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR humano con una afinidad que es similar a la afinidad de un dominio de unión a antígeno que comprende la secuencia de región pesada variable y la secuencia de región ligera variable de la molécula de anticuerpo RAA22 expuestas en SEQ ID NO: 16 y 20, respectivamente. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR humano con una afinidad que tiene una Kd que es menos de 5 veces diferente, menos de 4 veces diferente, menos de 3 veces diferente, menos de 2- veces diferente, menos de 1 vez diferente o menos de 0.5 veces diferente que un dominio de unión a antígeno que comprende la secuencia de región pesada variable y la secuencia de región ligera variable de la molécula de anticuerpo RAA22 expuesta en SEQ ID NO: 16 y 20, respectivamente, se une al EGFR humano.

El dominio de unión a antígeno que se une a EGFR también puede unirse a EGFR de macaco cynomolgus. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR de macaco cynomolgus con una afinidad que tiene una Kd inferior a 700 nM, inferior a 600 nM, inferior a 500 nM, inferior a 400 nM, inferior a 300 nM, o inferior a 250 nM. Alternativamente, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR de macaco cynomolgus con una afinidad que tiene una Kd de entre 100 y 700 nM, entre 100 y 600 nM, entre 100 y 500 nM, entre 100 y 400 nM, entre 100 y 300 nM, entre 150 y 250 nM, entre 100 y 200 nM. El dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR

de macaco cynomolgus con una Kd que es inferior o igual a 10 veces, 9 veces, 8 veces, 7 veces, 6 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces mayor que Kd del dominio de unión a antígeno que se une a EGFR humano.

El dominio de unión a antígeno que se une a EGFR también puede unirse a EGFR de ratón. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR de ratón con una afinidad que tiene una Kd inferior a 1  $\mu$ M, inferior a 900 nM, inferior a 800 nM, inferior a 700 nM, inferior a 600 nM, o inferior a 650 nM. Alternativamente, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR de ratón con una Kd de entre 100 nM y 1  $\mu$ M, entre 200 y 900 nM, entre 300 y 800 nM, entre 400 y 700 nM, entre 400 y 600 nM o entre 450 y 550 nM.

Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR humano y EGFR de macaco cynomolgus. Esta reactividad cruzada es ventajosa, ya que permite realizar pruebas de dosificación y seguridad de las moléculas de anticuerpo y conjugados en macacos cynomolgus durante el desarrollo preclínico. Incluso más preferiblemente, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR humano, EGFR de macaco cynomolgus y EGFR de ratón. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR puede unirse a EGFR humano, EGFR de macaco cynomolgus y EGFR de ratón con los valores de Kd establecidos anteriormente (por ejemplo, EGFR humano con una Kd de entre 10 y 100 nM, EGFR de macaco cynomolgus con una Kd de entre 100 y 700 nM y EGFR de ratón con una Kd de entre 100 nM y 1  $\mu$ M).

#### *Afinidad de c-Met*

El dominio de unión a antígeno que se une a c-Met puede unirse a c-Met humana con una afinidad que tiene una Kd inferior a 20 nM, 15 nM, 12 nM, 11 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM o 2.5 nM. Alternativamente, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met puede unirse a c-Met humana con una afinidad que tiene una Kd de entre 1 y 20 nM, entre 1 y 15 nM, entre 1 y 10 nM, entre 1 y 9 nM, entre 1 y 8 nM, entre 1 y 7 nM, entre 1 y 6 nM, entre 1 y 5 nM, entre 1 y 4 nM, entre 1 y 3 nM, entre 1 y 2.5 nM, o entre 2 y 2.5 nM.

El dominio de unión a antígeno que se une a c-Met puede unirse a c-Met de macaco cynomolgus. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met puede unirse a c-Met de macaco cynomolgus con una afinidad que tiene una Kd que es inferior a 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM o 2.5 nM. Alternativamente, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met puede unirse a c-Met de macaco cynomolgus con una afinidad que tiene una Kd de entre 1 y 20 nM, entre 1 y 15 nM, entre 1 y 10 nM, entre 1 y 9 nM, entre 1 y 8 nM, entre 1 y 7 nM, entre 1 y 6 nM, entre 1 y 5 nM, entre 1 y 4 nM, entre 1 y 3 nM, entre 1 y 2.5 nM, o entre 2 y 2.5 nM. El dominio de unión a

antígeno que se une a c-Met puede unirse a c-Met de macaco cynomolgus con una afinidad que tiene una Kd que es inferior o igual a 10 veces, 9 veces, 8 veces, 7 veces, 6 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces, 1 vez mayor a la Kd del dominio de unión a antígeno que se une a c-Met humana.

- 5 Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met que puede unirse a c-Met humana y c-Met de macaco cynomolgus. Esta reactividad cruzada es ventajosa, ya que permite realizar pruebas de dosificación y seguridad de las moléculas de anticuerpo en macacos cynomolgus durante el desarrollo preclínico. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met puede unirse a c-Met humana y c-Met de macaco cynomolgus con los valores de Kd establecidos anteriormente (por ejemplo, c-Met humana con una Kd de entre 1 y 20 nM y c-Met de macaco cynomolgus con una Kd de entre 1 y 20 nM).

#### *Unión específica*

- Las moléculas de anticuerpo y los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender un dominio de unión a antígeno que se une a EGFR que es un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a EGFR. Las moléculas de anticuerpo y los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender un dominio de unión a antígeno que se une a c-Met que es un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a c-Met. Las moléculas de anticuerpo y los conjugados descritos en el presente documento pueden comprender un primer dominio de unión a antígeno que se une a EGFR, que es un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a EGFR, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a c-Met, que es un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a c-Met.

- El término "específico" puede referirse a la situación en la que el dominio de unión a antígeno no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su(s) pareja(s) de unión específica(s), aquí EGFR o c-Met. Tales moléculas se denominan "moléculas no diana". El término "específico" también es aplicable cuando la molécula de anticuerpo es específica para epítopos particulares, como epítopos en EGFR o c-Met, que son transportados por varios antígenos, en cuyo caso la molécula de anticuerpo podrá unirse a los diversos antígenos portadores del epítipo.

- 30 En algunos casos, se considera que una molécula de anticuerpo o conjugado no muestra ninguna unión significativa a una molécula no diana si el grado de unión a una molécula no diana es inferior al 10 % de la unión del anticuerpo a la diana tal como se mide, por ejemplo, por ELISA, SPR, interferometría de biocapa (BLI), termoforesis a microescala (MST) o por un radioinmunoensayo (RIA). Alternativamente, la especificidad de unión puede reflejarse en términos de afinidad de unión, donde la molécula de anticuerpo o el conjugado

descrito en el presente documento se une a EGFR y/o c-Met con una afinidad que es al menos 0.1 órdenes de magnitud mayor que la afinidad hacia otra molécula no diana. En algunos casos, la molécula de anticuerpo o el conjugado de la presente divulgación se une a EGFR y/o c-Met con una afinidad que es una de al menos 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5 o 2.0 órdenes de magnitud mayor que la afinidad hacia otra molécula no diana.

EGFR es un miembro de la familia de receptores ErbB, una subfamilia de cuatro receptores tirosina cinasa estrechamente relacionados: EGFR, HER2, HER3 y HER4. El dominio de unión a antígeno RAA22 no mostró unión a HER2, HER3 y HER4, lo que demuestra que este dominio de unión a antígeno se une específicamente a EGFR. Así, en un ejemplo preferido, el dominio de unión a antígeno que se une a EGFR no se une, o no muestra ninguna unión significativa, a HER2, HER3 o HER4.

c-Met es un miembro de la subfamilia de receptores tirosina cinasa que incluye Ron y Sema 4a. El dominio de unión a antígeno B09-GL no mostró unión a Ron y Sema 4a, lo que demuestra que este dominio de unión a antígeno se une específicamente a c-Met. Así, en un ejemplo preferido, el dominio de unión a antígeno que se une a c-Met no se une, o no muestra ninguna unión significativa, a Ron, Sema 4a.

#### *Interacción simultánea*

Las moléculas de anticuerpo y los conjugados que comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une a EGFR y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a c-Met descritos en el presente documento pueden caracterizarse por la capacidad de ambos dominios de unión a antígeno para interactuar simultáneamente con sus respectivas dianas EGFR y c-Met. Se espera que las moléculas de anticuerpo y los conjugados con la capacidad de interactuar simultáneamente con EGFR y c-Met sean ventajosos, ya que se sabe que numerosos tumores coexpresan tanto EGFR como c-Met y, por lo tanto, pueden ser la diana de las moléculas de anticuerpo de la divulgación. Por lo tanto, en algunos casos, la molécula de anticuerpo o el conjugado puede interactuar simultáneamente con EGFR y c-Met.

La interacción simultánea puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro* que usa una línea celular que expresa cantidades aproximadamente iguales de EGFR y c-Met y un conjugado que comprende las moléculas de anticuerpo con dominios de unión a antígeno EGFR y c-Met. Si los dominios de unión a antígeno individuales en el conjugado funcionan de forma independiente para administrar el fármaco, se esperaría que el bloqueo de cualquier diana en esta línea celular redujera solo modestamente la actividad del conjugado, desplazando la CI<sub>50</sub> 2 veces o menos, ya que las dianas están presentes en niveles similares. Las dianas EGFR y c-Met se pueden bloquear en este ensayo utilizando, por ejemplo, una molécula de anticuerpo monoespecífica que se une a la misma

región en EGFR o c-Met, pero carece de un fármaco capaz de inducir citotoxicidad. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo monoespecífica puede contener el mismo dominio de unión a antígeno que se une a EGFR, o el mismo dominio de unión a antígeno que se une a c-Met, que el conjugado que se somete a prueba. Si, por otro lado, el conjugado requiere una interacción simultánea para administrar de manera eficaz el conjugado en las células, es probable que el bloqueo de cualquier diana tenga un mayor impacto en la actividad del conjugado. Es decir, se considera que la molécula de anticuerpo puede interactuar con ambas dianas de manera simultánea si hay un desplazamiento de la CI50 de al menos 2 veces, preferiblemente al menos 5 veces, incluso más preferiblemente al menos 10 veces después de bloquear cualquier diana cuando se usa este ensayo.

Un método adicional para determinar la interacción simultánea es comparar la actividad del conjugado biespecífico de EGFR-c-Met con conjugados control monoespecíficos, monovalentes en un ensayo de citotoxicidad *in vitro*. Los conjugados control comprenden un dominio de unión a antígeno para EGFR o c-Met y un dominio de unión a antígeno de control de anticuerpo de isotipo no vinculante. Si cada dominio de unión a antígeno en el conjugado biespecífico funciona de forma independiente, el resultado esperado sería que cada conjugado control monoespecífico sería solo ligeramente menos potente que el conjugado biespecífico, y la diferencia sería aditiva. Alternativamente, si los dos dominios de unión a antígeno del conjugado biespecífico funcionan sinérgicamente mediante la unión simultánea, se esperarían mayores diferencias en la actividad del conjugado biespecífico en comparación con los anticuerpos control monoespecíficos. Es decir, se considera que la molécula de anticuerpo puede interactuar con ambas dianas de manera simultánea si el conjugado biespecífico da como resultado un desplazamiento de la CI50 que es mayor que la suma de los desplazamientos de la CI50 observados usando los conjugados control monoespecíficos.

En los ejemplos se pueden encontrar más detalles de estos métodos para medir la interacción simultánea.

#### *Internalización de anticuerpos*

Las moléculas de anticuerpo y los conjugados descritos en el presente documento pueden caracterizarse por su capacidad para mediar en la internalización eficaz. Esto es particularmente útil para los conjugados, ya que garantiza que el conjugado se internalice en la célula y se administre a los lisosomas, donde la molécula de anticuerpo se degrada posteriormente y el fármaco se libera en la célula, donde ejerce sus efectos celulares, por ejemplo la citotoxicidad.

La internalización de una molécula de anticuerpo o conjugado por parte de las células se puede analizar poniendo en contacto células vivas con la molécula de anticuerpo y

detectando la molécula de anticuerpo o el conjugado después de un período de tiempo suficiente para la internalización. La internalización puede determinarse mediante la detección de la localización de la molécula de anticuerpo o el conjugado. Cuando la molécula de anticuerpo o el conjugado permanece en la superficie de la célula (por ejemplo, se detecta en la superficie celular y/o no se detecta dentro de la célula), se determina que la molécula de anticuerpo o el conjugado no se ha internalizado. Cuando la molécula de anticuerpo o el conjugado se detecta dentro de la célula (p. ej., localizado en el citoplasma o en un orgánulo celular), se determina que la molécula de anticuerpo o el conjugado se ha internalizado.

Un método a modo de ejemplo para visualizar si la molécula de anticuerpo o el conjugado puede mediar en la internalización eficiente implica marcar la molécula de anticuerpo con colorantes sensibles al pH que muestren fluorescencia a un pH ácido y agregar estas moléculas de anticuerpo o conjugados marcados a las células. La internalización en la célula puede detectarse controlando la fluorescencia. Se considera que la molécula de anticuerpo o el conjugado pueden mediar en la internalización y en la administración a los lisosomas si la fluorescencia observada es mayor que la de una molécula de anticuerpo o conjugado control de no unión marcado durante un cierto período de tiempo, por ejemplo, 48 horas. En los ejemplos se pueden encontrar más detalles de este método para visualizar la internalización de anticuerpos.

Las moléculas de anticuerpo o los conjugados que comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une a EGFR y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a c-Met pueden caracterizarse por su capacidad para mediar en una internalización más eficiente en comparación con los controles monoespecíficos de EGFR o c-Met. Se espera que las moléculas de anticuerpo y los conjugados que exhiben estas propiedades sean ventajosos, ya que se espera que muestren una mayor selectividad hacia las células tumorales que co-expresan ambas dianas y podrían minimizar el impacto de la molécula de anticuerpo en tejidos normales que no muestran niveles significativos de co-expresión.

#### *Actividad in vitro*

Las moléculas de anticuerpo o los conjugados descritos en el presente documento pueden caracterizarse por su actividad citotóxica, es decir, su capacidad para destruir células. La actividad citotóxica puede medirse utilizando un ensayo de viabilidad celular *in vitro*, tal como el ensayo CellTiter-Glo® (Promega), por ejemplo. En algunos ejemplos, las células son células que expresan tanto EGFR como c-Met.

La potencia de una molécula de anticuerpo puede expresarse como un valor de CI50. La CI50 es la mediana de la concentración inhibidora de una molécula de un anticuerpo. En ensayos funcionales, la CI50 es la concentración que reduce una respuesta biológica en un

50 % de su máximo. La CI50 puede calcularse mediante cualquiera de los diversos medios conocidos en la técnica.

En algunos ejemplos, las moléculas de anticuerpo o los conjugados descritos en el presente documento que tienen actividad citotóxica tienen una CI50 de menos de 4000 pM, menos de 3500 pM, menos de 3000 pM, menos de 2500 pM, menos de 2000 pM, menos de 1500 pM, menos de 1000 pM, menos de 500 pM, menos de 400 pM, menos de 300 pM, menos de 250 pM, menos de 200 pM, menos de 150 pM o menos de 100 pM cuando se mide usando un ensayo de viabilidad celular *in vitro*. En algunos ejemplos, las moléculas de anticuerpo o los conjugados descritos en el presente documento pueden tener una CI50 de entre 60 y 500 pM.

En algunos ejemplos, las moléculas de anticuerpo o los conjugados descritos en el presente documento pueden aumentar la destrucción de células, por ejemplo células tumorales, que expresan cantidades significativas tanto de EGFR como de c-Met en comparación con células que expresan niveles bajos de uno u otro de EGFR y c-Met. Las células que expresan cantidades significativas tanto de EGFR como de c-Met pueden determinarse midiendo la densidad relativa del receptor en la superficie celular. Por ejemplo, las células que expresan EGFR y c-Met con una densidad relativa del receptor en la superficie celular superior a 15,000 pueden considerarse células que expresan cantidades significativas tanto de EGFR como de c-Met y células que expresan una de EGFR y c-Met con una baja densidad relativa del receptor en la superficie celular de 15,000 o menos. La densidad relativa de EGFR y c-Met puede medirse, por ejemplo, usando el kit de ensayo FACS cuantitativo Quantum MESF como se describe en los ejemplos.

Los ejemplos de células que expresan cantidades significativas tanto de EGFR como de c-Met pueden incluir las líneas celulares NCI H596, HCC 827 GR Pool, A549, NCI H1792, NCI H1975, NCI H292 y NCI H358. Los ejemplos de células que expresan uno de EGFR y c-Met con una densidad relativa del receptor baja pueden incluir líneas celulares A427, NCI H23 y NCI H661 (Ag negativas). Estas líneas celulares están disponibles a través de la ATCC.

En algunos ejemplos, las moléculas de anticuerpo o los conjugados descritos en el presente documento son capaces de producir actividad citotóxica en células que son resistentes a inhibidores de la tirosina cinasa (TKI). Los ejemplos de células resistentes a TKI pueden incluir NCI H1975 (mutaciones de EGFR: T790M, L858R) y HCC827 GR Pool (deleción de  $\Delta 746-750$  de EGFR + amplificación de MET).

#### *Actividad in vivo*

En algunos ejemplos, las moléculas de anticuerpo o los conjugados descritos en el presente documento pueden inhibir el desarrollo o la progresión de un cáncer.

El cáncer puede ser un cáncer que expresa tanto EGFR como c-Met. Las células del cáncer pueden expresar EGFR y c-Met en la superficie celular. El cáncer puede ser por ejemplo cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)), cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y  
 5 cuello, cáncer de ovario o glioblastoma.

La capacidad de una determinada molécula de anticuerpo o conjugado para inhibir el desarrollo o la progresión de un cáncer se puede analizar, por ejemplo, usando un modelo *in vivo*. Por ejemplo, el modelo *in vivo* puede implicar medir el crecimiento del tumor en un modelo de xenoinjerto derivado del paciente (PDX). Más detalles de este método a modo de  
 10 ejemplo se describen en los ejemplos.

La inhibición del desarrollo de un cáncer puede deducirse mediante la observación de un crecimiento tumoral más lento o una disminución del tamaño del tumor después de la administración de la molécula de anticuerpo o del conjugado, por ejemplo, midiendo la inhibición del crecimiento tumoral (%TGI). El %TGI puede medirse comparando el tamaño del  
 15 tumor medido el día 0 con el tamaño del tumor medido al final del tiempo de estudio para aquellos sujetos a los que se administró la molécula de anticuerpo o el conjugado, y comparando este con el crecimiento del tumor durante el mismo período de tiempo para los sujetos a los que se administró una molécula de anticuerpo o conjugado control. De esta forma, el %TGI puede definirse como porcentaje de crecimiento tumoral versus día 0 entre los  
 20 grupos de tratamiento (TX) y control (C), según la fórmula:  $\%TGI = (1 - (TX_{final} - TX_{inicial}) / (C_{final} - C_{inicial})) \times 100$ .

En algunos ejemplos, la molécula de anticuerpo o el conjugado descrito en el presente documento tiene un %TGI de al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el  
 25 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %.

La inhibición del desarrollo de un cáncer puede deducirse mediante la observación de un inicio retardado o impedido y/o una gravedad reducida de los síntomas del cáncer en respuesta al tratamiento con la molécula de anticuerpo. La inhibición de la progresión de un  
 30 cáncer puede deducirse mediante la observación de invasión y/o metástasis retardada, impedida y/o reducida en respuesta al tratamiento con la molécula de anticuerpo.

La molécula de anticuerpo descrita en el presente documento puede inhibir el desarrollo o la progresión de un cáncer en menos del 100 %, por ejemplo uno del 99 % o menos, 95 % o menos, 90 % o menos, 85 % o menos, 75 % o menos, 70 % o menos, 65 % o  
 35 menos, 60 % o menos, 55 % o menos, 50 % o menos, 45 % o menos, 40 % o menos, 35 % o

menos, 30 % o menos, 25 % o menos, 20 % o menos, 15 % o menos, 10 % o menos, 5 % o menos, o el 1 % o menos del desarrollo/progresión del cáncer en ausencia de tratamiento con la molécula de anticuerpo (o tratamiento con un control apropiado). En algunos casos, la molécula de anticuerpo descrita en el presente documento puede inhibir el desarrollo o la progresión de un cáncer en menos de 1 vez, por ejemplo uno de  $\leq 0.99$  veces,  $\leq 0.95$  veces,  $\leq 0.9$  veces,  $\leq 0.85$  veces,  $\leq 0.8$  veces,  $\leq 0.75$  veces,  $\leq 0.7$  veces,  $\leq 0.65$  veces,  $\leq 0.6$  veces,  $\leq 0.55$  veces,  $\leq 0.5$  veces,  $\leq 0.45$  veces,  $\leq 0.4$  veces,  $\leq 0.35$  veces,  $\leq 0.3$  veces,  $\leq 0.25$  veces,  $\leq 0.2$  veces,  $\leq 0.15$  veces,  $\leq 0.1$  veces el nivel de desarrollo/progresión del cáncer en ausencia de tratamiento con la molécula de anticuerpo (o tratamiento con un control adecuado).

En algunos ejemplos, el cáncer comprende células cancerosas que expresan altos niveles de EGFR y/o altos niveles de c-Met en la superficie celular. Los métodos para medir los niveles de EGFR y c-Met son conocidos en la técnica e incluyen inmunohistoquímica, por ejemplo.

En algunos ejemplos, las moléculas de anticuerpo o los conjugados descritos en el presente documento pueden aumentar la inhibición del desarrollo o la progresión de un cáncer en células que muestran niveles altos tanto de EGFR como c-Met en comparación con las células que expresan niveles bajos de uno u otro de EGFR y c-Met.

#### Ácidos nucleicos, vectores, células hospedadoras, expresión y purificación

La presente divulgación proporciona una molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento. En algunos ejemplos, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una región variable de cadena pesada de una molécula de anticuerpo divulgada en el presente documento, una secuencia de polinucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera de una molécula de anticuerpo divulgada en el presente documento, o ambas.

En algunos ejemplos, la molécula o moléculas de ácido nucleico se purifican o aíslan, por ejemplo de otro ácido nucleico, o material biológico que se produce de manera natural. El experto en la materia no tendría dificultad en preparar dichas moléculas de ácido nucleico utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

La molécula o moléculas de ácido nucleico pueden codificar el dominio VH y/o el dominio VL, preferiblemente el dominio VH y el dominio VL de: clon de anticuerpo anti-EGFR RAA22, clon de anticuerpo anti-EGFR QD6, clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL, preferiblemente clon de anticuerpo anti-EGFR RAA22, o clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL. Las secuencias de los dominios VH y VL de estos anticuerpos se describen en el presente documento. Cuando el ácido nucleico codifica el dominio VH y VL, o la cadena pesada y

ligera, de una molécula de anticuerpo de la divulgación, los dos dominios o cadenas pueden estar codificados en dos moléculas de ácido nucleico separadas.

Por ejemplo, la(s) molécula(s) de ácido nucleico puede(n) comprender:

- (i) la secuencia de ácido nucleico del dominio VH de RAA22 expuesta en SEQ ID NO: 17, y/o la secuencia de ácido nucleico del dominio VL de RAA22 expuesta en SEQ ID NO: 21;
- (ii) la secuencia de ácido nucleico del dominio VH de QD6 expuesta en SEQ ID NO: 19, y/o la secuencia de ácido nucleico del dominio VL de QD6 expuesta en SEQ ID NO: 23; o
- (iii) la secuencia de ácido nucleico del dominio VH de B09-GL expuesta en SEQ ID NO: 39, y/o la secuencia de ácido nucleico del dominio VL de B09-GL expuesta en SEQ ID NO: 41.

La(s) molécula(s) de ácido nucleico puede(n) codificar la cadena pesada y/o la cadena ligera, preferiblemente la cadena pesada y la cadena ligera de: clon de anticuerpo anti-EGFR RAA22, clon de anticuerpo anti-EGFR QD6, clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL, preferiblemente clon de anticuerpo anti-EGFR RAA22, o clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL. Las secuencias de cadena pesada y ligera de estas moléculas de anticuerpo se describen en el presente documento.

La presente divulgación también proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento.

Puede usarse una molécula de ácido nucleico aislada para expresar una molécula de anticuerpo de la divulgación. El ácido nucleico generalmente se proporcionará en forma de un vector recombinante para la expresión. Por lo tanto, otro aspecto de la divulgación proporciona un vector que comprende un ácido nucleico tal como se ha descrito anteriormente. Se pueden seleccionar o construir vectores adecuados que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluidas secuencias promotoras, fragmentos de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Preferiblemente, el vector contiene secuencias reguladoras apropiadas para impulsar la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora. Los vectores pueden ser plásmidos, virales p. ej. fago, o fagémidos, según sea apropiado.

Una molécula de ácido nucleico o un vector como se describe en el presente documento puede introducirse en una célula hospedadora. Las técnicas para la introducción de ácidos nucleicos o vectores en células hospedadoras están bien establecidas en la técnica y puede emplearse cualquier técnica adecuada. En la técnica se conoce una gama de células hospedadoras adecuadas para la producción de moléculas de anticuerpo recombinantes, e

incluyen células hospedadoras bacterianas, de levadura, de insecto o de mamífero. Una célula hospedadora preferida es una célula de mamífero, tal como una célula CHO, NS0 o HEK, por ejemplo, una célula HEK293.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un método para producir una molécula de anticuerpo de la divulgación que comprende expresar un ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo en una célula hospedadora y, opcionalmente, aislar y/o purificar la molécula de anticuerpo así producida. Los métodos para cultivar células hospedadoras son bien conocidos en la técnica. El método puede comprender además aislar y/o purificar la molécula de anticuerpo. Las técnicas para la purificación de moléculas de anticuerpo recombinantes son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, HPLC, FPLC o cromatografía de afinidad, por ejemplo usando Proteína A o Proteína L. En algunos ejemplos, la purificación se puede realizar usando una etiqueta de afinidad en la molécula de anticuerpo. El método también puede comprender formular la molécula de anticuerpo en una composición farmacéutica, opcionalmente con un excipiente farmacéuticamente aceptable u otra sustancia como se describe a continuación.

#### Tratamiento

Tal como se ha explicado anteriormente, la co-expresión de EGFR y c-Met se asocia con muchos tipos de cáncer y las moléculas de anticuerpo que se dirigen a ambas moléculas y especialmente conjugados que comprenden tales moléculas de anticuerpo proporcionan una oportunidad de un amplio beneficio clínico en múltiples indicaciones.

La molécula de anticuerpo o el conjugado como se describe en el presente documento puede ser útil para aplicaciones terapéuticas, en particular en el tratamiento del cáncer.

Una molécula de anticuerpo, un conjugado o una composición farmacéutica como se describe en el presente documento puede usarse en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal. Los aspectos relacionados de la divulgación proporcionan;

(i) una molécula de anticuerpo o conjugado descrito en el presente documento para su uso como medicamento,

(ii) una molécula de anticuerpo o conjugado descrito en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno,

(iii) una molécula de anticuerpo o conjugado descrito en el presente documento en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno; y

(iv) un método para tratar una enfermedad o trastorno en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de anticuerpo o conjugado como se describe en el presente documento.

El individuo puede ser un paciente, preferiblemente un paciente humano.

El tratamiento puede ser cualquier tratamiento o terapia en la que se logre algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición o el retraso del progreso de la afección, e incluye una reducción en la tasa de progreso, una detención en la tasa de progreso, mejora de la afección, cura o remisión (ya sea parcial o total) de la afección, previniendo, mejorando, 5 retrasando, mitigando o deteniendo uno o más síntomas y/o signos de la afección o prolongando la supervivencia de un individuo o paciente más allá de lo esperado en ausencia de tratamiento.

Un método de tratamiento tal como se ha descrito puede comprender administrar al menos un tratamiento adicional al individuo además de la molécula de anticuerpo o conjugado. 10 La molécula de anticuerpo o el conjugado descrito en el presente documento puede administrarse a un individuo solo o en combinación con uno o más de otros tratamientos. Cuando la molécula de anticuerpo o conjugado se administra al individuo en combinación con otro tratamiento, el tratamiento adicional puede administrarse al individuo al mismo tiempo, secuencialmente o por separado de la administración de la molécula de anticuerpo o 15 conjugado. Cuando el tratamiento adicional se administre simultáneamente con la molécula de anticuerpo o el conjugado, la molécula de anticuerpo y el tratamiento adicional pueden administrarse al individuo como un preparado combinado. Por ejemplo, la terapia adicional puede ser una terapia conocida o un agente terapéutico para la enfermedad a tratar.

Mientras que una molécula de anticuerpo puede administrarse sola, las moléculas de 20 anticuerpo o conjugados normalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además de la molécula de anticuerpo o conjugado. Por lo tanto, otro aspecto de la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo o un conjugado tal como se describe en el presente documento. También se proporciona un método que 25 comprende formular una molécula de anticuerpo o un conjugado en una composición farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, además de la molécula de anticuerpo o conjugado, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. El término 30 "farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, según un criterio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, ser humano) sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica ni otros problemas o complicaciones excesivos, de acuerdo con una relación de riesgo/beneficio razonable. Cada 35 portador, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de que sea compatible

con otros ingredientes de la formulación. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser por infusión, inyección o cualquier otra vía adecuada, como se analiza a continuación.

La administración puede ser en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficios en un individuo. La cantidad real administrada, y la tasa y la evolución temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se está tratando, el individuo particular que se está tratando, la afección médica del individuo, la causa del trastorno, el sitio de administración de la composición, el tipo de molécula de anticuerpo, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los facultativos médicos. La prescripción del tratamiento, p. ej., las decisiones en la dosificación etc., está comprendida en las competencias de los médicos de familia y otros médicos y podrá depender de la gravedad de los síntomas y/o evolución de la enfermedad que se está tratando. Las dosis apropiadas de moléculas de anticuerpo son bien conocidas en la técnica (Ledermann, 1991; y Bagshawe, 1991). Pueden usarse las dosificaciones específicas indicadas en el presente documento o en el Physician's Desk Reference (2003) según sea apropiado para una molécula de anticuerpo que está administrándose. Puede determinarse una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis adecuada de una molécula de anticuerpo comparando la actividad *in vitro* con la actividad *in vivo* en un modelo de animal. Los métodos para la extrapolación de dosificaciones efectivas en ratones y otros animales de prueba a los humanos son conocidos. La dosis precisa dependerá de una serie de factores, incluido el tamaño y la ubicación del área a tratar, y la naturaleza precisa de la molécula de anticuerpo.

En un ejemplo preferido, una molécula de anticuerpo o conjugado como se describe en el presente documento puede ser para su uso en un método para tratar el cáncer.

El cáncer puede caracterizarse por la proliferación anómala de células cancerosas malignas. Cuando se hace referencia a un tipo particular de cáncer, como el cáncer de mama, se hace referencia a una proliferación anómala de células malignas del tejido pertinente, como el tejido mamario. Un cáncer secundario que se localiza en la mama pero que es el resultado de una proliferación anómala de células malignas de otro tejido, tal como tejido ovárico, no es un cáncer de mama como se hace referencia en el presente documento sino un cáncer de ovario.

El cáncer puede ser un cáncer primario o un cáncer secundario. Por lo tanto, una molécula de anticuerpo o conjugado como se describe en el presente documento puede ser para su uso en un método para tratar el cáncer en un individuo, en donde el cáncer es un tumor primario y/o una metástasis tumoral.

Un tumor de un cáncer a tratar usando una molécula de anticuerpo o un conjugado como se describe en el presente documento puede coexpresar EGFR y c-Met. En un ejemplo, se puede haber determinado que el tumor coexpresaba EGFR y c-Met. Los métodos para determinar la expresión de una diana son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, inmunohistoquímica.

Por ejemplo, el cáncer a tratar usando una molécula de anticuerpo o conjugado como se describe en el presente documento puede seleccionarse del grupo que consiste en: cáncer de pulmón (como el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)), cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario o glioblastoma.

En un ejemplo preferido, el cáncer a tratar usando una molécula de anticuerpo o conjugado como se describe en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de pulmón (como el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)), cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer colorrectal y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN o SQHN). En un ejemplo el cáncer a tratar es el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). En un ejemplo, el cáncer es carcinoma escamoso de cabeza y cuello (SCCHN).

En el contexto del cáncer, el tratamiento puede incluir la inhibición del crecimiento del cáncer, incluida la remisión completa del cáncer y/o la inhibición de la metástasis del cáncer, así como la inhibición de la recurrencia del cáncer. El crecimiento del cáncer generalmente se refiere a una cualquiera de una serie de índices que indican un cambio dentro del cáncer a una forma más desarrollada. Por lo tanto, los índices para medir una inhibición del crecimiento del cáncer incluyen una disminución de la supervivencia de las células cancerosas, una disminución del volumen o la morfología del tumor (por ejemplo, según lo determinado usando tomografía computarizada (TC), ecografía u otro método de diagnóstico por imágenes), un retraso en el crecimiento del tumor, una destrucción de la vasculatura tumoral, un rendimiento mejorado en la prueba cutánea de hipersensibilidad retardada, un aumento de la actividad de las células inmunitarias anticancerígenas u otras respuestas inmunitarias anticancerígenas y una disminución de los niveles de antígenos específicos de tumor. Activar o potenciar las respuestas inmunitarias a los tumores cancerosos en un individuo puede mejorar la capacidad del individuo para resistir el crecimiento del cáncer, en particular el crecimiento de un cáncer ya presente en el sujeto y/o disminuir la propensión al crecimiento del cáncer en el individuo.

Las características divulgadas en la descripción anterior, o en las siguientes reivindicaciones, o en los dibujos adjuntos, expresadas en sus formas específicas o en términos de un medio para realizar la función divulgada, o un método o proceso para obtener

los resultados divulgados, según proceda, pueden, por separado, o en cualquier combinación de tales características, utilizarse para realizar la divulgación de diferentes formas de la misma.

5 Si bien la divulgación se ha descrito junto con los ejemplos ilustrativos descritos anteriormente, muchas modificaciones y variaciones equivalentes serán evidentes para los expertos en la materia cuando se les proporcione esta divulgación. Por consiguiente, los ejemplos a modo de ejemplo de la divulgación expuestos anteriormente se consideran ilustrativos y no limitantes. Pueden realizarse diferentes cambios en los ejemplos descritos sin apartarse del espíritu ni del alcance de la divulgación.

10 Para evitar cualquier duda, cualquier explicación teórica proporcionada en el presente documento se proporciona con el fin de mejorar la comprensión del lector. Los inventores no desean verse limitados por ninguna de estas explicaciones teóricas.

15 Cualquier encabezado de sección que se utiliza en el presente documento tiene fines meramente organizativos y no se debe interpretar como limitante de la materia objeto que se describe.

A lo largo de esta memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones que la siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que el término "comprenden" e "incluyen", y las variaciones tales como "comprende", "que comprende" y "que incluye" implican la inclusión de un elemento integrante o etapa, o grupo de elementos integrantes o de etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento integrante o etapa, o grupo de elementos integrantes o de etapas.

25 Cabe señalar que, como se utilizan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Los intervalos pueden expresarse en el presente documento como desde "aproximadamente" un valor particular, y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa tal intervalo, otro ejemplo incluye desde el valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otro ejemplo. El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico es opcional y significa, por ejemplo, +/- 10 %.

### **EJEMPLOS**

#### **EJEMPLO 1: diseño y construcción de DuetMAb RAA22/B09**

35 Este ejemplo describe la creación de moléculas de anticuerpo biespecíficas que pueden unirse tanto a EGFR como a c-Met.

### *1.1 Aislamiento e identificación del anticuerpo anti-cMET 0021U3-B09*

Se aislaron anticuerpos scFv específicos de cMET a partir de una gran biblioteca de presentación en fagos de scFv humanos no tratados en una serie de ciclos de selección de barrido repetidos en cMET humana monomérica biotinilada expresada en mamíferos recombinante (MedImmune) esencialmente como se describe (Vaughan, 1996). Los ScFv de la ronda 2 del resultado de la selección se expresaron en el periplasma bacteriano y se examinaron para determinar su capacidad para inhibir la unión del receptor cMET humano con el ligando HGF en un ensayo de unión inhibidora del receptor del ligando HGF:cMET HTRF® (fluorescencia homogénea son resolución temporal). Se seleccionaron los casos más importantes que exhibían un fuerte efecto inhibidor y se sometieron a secuenciación de ADN. A continuación, los genes únicos se convirtieron en anticuerpos de inmunoglobulina humana G2 (IgG2) y se produjeron en células de mamífero esencialmente como se describe (Persic; 1997). A continuación, los anticuerpos purificados se clasificaron en función de su efecto inhibidor en el ensayo de unión de HGF:cMET HTRF®. El anticuerpo más potente, 0021U3-B09, se seleccionó para caracterización adicional.

### *1.2 Optimización del anticuerpo anti-cMET 0021U3-B09.*

Para minimizar la inmunogenicidad potencial, los residuos de estructura no Vernier (Foote y Winter 1992) en las regiones de estructura variable de 0021U3-B09 se dirigieron específicamente y se alteraron para que coincidieran con la secuencia de la línea germinal humana más cercana. En la región VH, se mutaron siete residuos de aminoácidos para que coincidieran con la secuencia de la línea germinal humana de referencia IGHV1-8\*01. En la región VL, se mutaron tres residuos para que coincidieran con la secuencia de la línea germinal humana de referencia IGKV1-5\*03. Todos los residuos en las regiones VH y VL se cambiaron con éxito a los residuos de la línea germinal sin pérdida de actividad. Se optimizó la afinidad de 0021U3-B09 usando un método de mutagénesis basado en hibridación esencialmente como se describe (Kunkel 1985). Se creó una gran biblioteca de scFv derivada de la secuencia de 0021U3-B09 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos de las regiones 3 determinantes de complementariedad de VH (CDR3) utilizando técnicas estándares de biología molecular. La biblioteca se sometió a selecciones de fase de solución basadas en la afinidad para seleccionar variantes con una mayor afinidad por los antígenos cMET humanos y de macaco cynomolgus. Los extractos periplásmicos crudos que contienen scFv de los resultados de la selección dirigidos a CDR se seleccionaron para mejorar la actividad inhibidora en el ensayo de unión de HGF:cMET HTRF®. Las variantes que mostraban un efecto inhibidor significativamente mejorado en comparación con el 0021U3-B09 original se sometieron a secuenciación de ADN y los genes únicos se convirtieron en IgG2

humana. A continuación, los anticuerpos purificados se clasificaron en función de su efecto inhibidor. El anticuerpo más potente, B09-57, se seleccionó para caracterización adicional.

### *1.3 Aislamiento e identificación del anticuerpo anti-EGFR Tdev-0004.*

Se aislaron anticuerpos scFv específicos de EGFR a partir de una gran biblioteca de presentación en fagos de scFv humanos no tratados en una serie de ciclos de selección de barrido repetidos en EGFR humano monomérico biotinilado expresado en mamíferos recombinante (MedImmune) esencialmente como se describe (Vaughan, 1996). Los fagos que presentan scFv de la ronda 3 del resultado de la selección se seleccionaron para determinar su unión a EGFR humano y de macaco cynomolgus en ELISA. Se seleccionaron los mejores resultados que mostraban reactividad cruzada y se sometieron a secuenciación de ADN. A continuación, los genes únicos se convirtieron en anticuerpos de inmunoglobulina humana G1 (IgG1) y se produjeron en células de mamífero esencialmente como se describe (Persic, 1997). A continuación, los anticuerpos purificados se clasificaron en función de su unión a la línea celular que expresa EGFR, A431, mediante citometría de flujo. Se seleccionó el anticuerpo Tdev-0004 que presentaba unión celular específica para caracterización adicional.

### *1.4 Optimización del anticuerpo anti-EGFR Tdev-0004.*

Las variantes RAA22 y QD6 se derivaron mediante optimización del Acm Tdev-0004 anti-EGFR. Las estructuras VL de Tdev-0004 tenían una coincidencia del 100 % con la secuencia de la línea germinal humana de referencia IGLV2-11\*01/IGLJ2 (véase [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/ldlink.cgi?seqname=IGLV2-11\\*01&taxid=9606&dbname=IG\\_DB%2Fimgt.Homo\\_sapiens.V.f.orf.p](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/ldlink.cgi?seqname=IGLV2-11*01&taxid=9606&dbname=IG_DB%2Fimgt.Homo_sapiens.V.f.orf.p)), sin embargo, las estructuras VH tenían un 79 % de homología con la línea germinal humana más cercana IGHV1-69\*01/JH4 (véase [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/ldlink.cgi?seqname=IGHV1-69\\*01&taxid=9606&dbname=IG\\_DB%2Fimgt.Homo\\_sapiens.V.f.orf.p](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/ldlink.cgi?seqname=IGHV1-69*01&taxid=9606&dbname=IG_DB%2Fimgt.Homo_sapiens.V.f.orf.p)). Para minimizar la inmunogenicidad potencial, la región VH se germinó inicialmente por completo mediante la mutación de los 13 residuos estructurales distintos de la línea germinal. Tras la germinación, la unión de la variante completamente germinada al EGFR de macaco cynomolgus se vio significativamente afectada. Para restaurar la unión a EGFR de macaco cynomolgus, cuatro residuos distintos de la línea germinal; K68, I73, R76 y T78 se retromutaron selectivamente. Los residuos de aminoácidos se numeran mediante el sistema de numeración de Kabat (Kabat y Wu 1991). La variante resultante, parcialmente germinada, denominada H4, se usó como secuencia molde para la optimización de la afinidad. La variante H4 se optimizó por afinidad mediante mutagénesis parsimoniosa de las seis CDR utilizando un kit de mutagénesis dirigida a sitios múltiples QuikChange Lightning (Agilent), de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. Se expresaron bibliotecas de VH y VL mutagenizadas de un solo aminoácido en bacterias como fragmentos Fab y se seleccionaron para mejorar la unión a EGFR humano y de macaco cynomolgus en ELISA. Las variantes que mostraban una unión mejorada en comparación con el H4 original se sometieron a secuenciación de ADN y los genes únicos se convirtieron en IgG1 humana. La variante RAA22 se identificó con una sola mutación en CDRH3. Para mejorar aún más la afinidad, las mutaciones positivas individuales se combinaron para crear una biblioteca combinatoria que se exploró para detectar variantes con unión mejorada a EGFR humano y de macaco cynomolgus. La variante QD6 se identificó con cuatro mutaciones combinadas en CDRL2, CDRL3 y CDRH3.

#### 10           1.5 Generación de anticuerpos DuetMab anti-EGFR/cMET biespecíficos monovalentes.

Los dominios variables del Acm anti-cMET B09-57 y Acm anti-EGFR RAA22 y QD6 se utilizaron para la construcción de anticuerpos anti-EGFR/cMET monovalentes biespecíficos en la estructura principal de la plataforma DuetMab (Mazor, 2015). Específicamente, el gen VH del anti-cMET B09-57 se insertó en una cadena pesada constante gamma-1 humana que portaba la mutación "botón" (T366W) y las mutaciones de cisteína intercatenarias alternativas (F126C y C219V). El gen VL de B09-57 se insertó en marco en un dominio constante Kappa humano que porta las mutaciones de cisteína intercatenarias alternativas correspondientes (S121C y C214V) diseñadas para emparejarse con la cadena pesada "botón". De manera similar, los genes VH de anti-EGFR RAA22 y QD6 optimizado por afinidad se insertaron en una cadena pesada constante gamma-1 humana que porta las mutaciones "ojal" (T366S, L368A y Y407V), mientras que los genes VL de RAA22 y B09-57 se insertaron en marco en un dominio constante Lambda humano diseñado para emparejarse con la cadena pesada "ojal". Además, dos residuos en los dominios CH3 de las cadenas pesadas "botón" y "ojal" se mutaron a cisteína (S354C en "botón" e Y349C en "ojal") para formar un puente disulfuro estabilizador. El dominio Fc se modificó por ingeniería adicionalmente para llevar una inserción de cisteína después de la serina 239 (C239i / "Maia") diseñada para permitir la conjugación específica del sitio de fármacos citotóxicos que llevan maleimida (Dimasi, 2017). Los residuos de aminoácidos se numeran mediante el sistema de numeración de Kabat (Kabat y Wu 1991). Los anticuerpos DuetMab anti-EGFR/cMET monovalentes biespecíficos ensamblados se designaron como RAA22/B09-57 y QD6/B09-57 (**FIG. 1**). Los anticuerpos DuetMab se produjeron a partir de células de mamíferos como se describió anteriormente (Mazor, 2017).

Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de los DuetMab producidos según este ejemplo se proporcionan en la siguiente tabla:

|                       | RAA22/B09-57 | QD6/B09-57 |
|-----------------------|--------------|------------|
| Cadena pesada de EGFR | 56           | 53         |
| Cadena pesada c-Met   | 50           | 50         |
| Cadena ligera de EGFR | 58           | 55         |
| Cadena ligera c-Met   | 52           | 52         |

### EJEMPLO 2 –Propiedades bioquímicas y biofísicas

Este ejemplo prueba diversas propiedades bioquímicas y biofísicas de los anticuerpos monoclonales RAA22, QD6 y B09-57 y las moléculas de anticuerpo biespecíficas RAA22/B09-57 y QD6/B09-57, incluida su afinidad de unión a EGFR y c-Met, respectivamente, y su capacidad para unir ambos antígenos simultáneamente.

#### *2.1 Afinidad de unión de DuetMab y mAb parentales para EGFR y cMET.*

Las constantes de velocidad cinética (kon y koff) y las constantes de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) de DuetMab de EGFR-cMET para antígenos EGFR y cMET recombinantes humanos, de macaco cynomolgus y murinos se determinaron a 25 °C mediante SPR usando un ensayo de captura de anticuerpos en un instrumento BIAcore T200 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA). Se inmovilizó IgG antihumana de ratón en un chip sensor CM4 con una densidad de superficie final de ~2000 unidades de resonancia (UR). También se preparó una superficie de flujo celular de referencia en este chip sensor utilizando el mismo protocolo de inmovilización. Los anticuerpos del artículo de prueba y de control se prepararon a 5-20 nM en tampón del instrumento (tampón HBS-EP; HEPES 0.01 M, pH 7.4, NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM y P-20 al 0.005 %), junto con diluciones en serie de 3 veces de EGFR purificado (0.27 - 200 nM humano, 0.4 - 900 nM cyno y 4-1000 nM murino) o proteínas cMET (0.27 a 66 nM humana y 0.27 - 22 nM cyno) en tampón del instrumento. Se empleó una estrategia secuencial para las mediciones cinéticas. Primero se inyectaron los anticuerpos sobre la superficie de captura, a una velocidad de flujo de 10 µl/minuto. Una vez que se estabilizó la unión del anticuerpo capturado, se inyectó una única concentración del analito sobre las superficies de captura y de referencia, a una velocidad de flujo de 75 µl/minuto. Las curvas de respuesta a la unión resultantes proporcionaron los datos sobre la fase de asociación. Tras la inyección del analito, el flujo se revertió posteriormente al tampón del instrumento durante 15 minutos para permitir la recopilación de datos sobre la fase de disociación, seguido de un pulso de 1 minuto de glicina 10 mM, pH 1.5 para regenerar la superficie de anticuerpo capturado sobre el chip. Las respuestas de unión contra los anticuerpos del artículo de prueba y de control se registraron a partir de inyecciones duplicadas de cada concentración de analito. Además, se intercalaron

varias inyecciones de tampón a lo largo de la serie de inyecciones. Se emplearon inyecciones de tampón seleccionadas junto con las respuestas de las células de referencia para corregir los conjuntos de datos sin procesar respecto a los dispositivos de inyección y/o interacciones de unión no específicas que se suelen denominar normalmente "referencia doble". Los datos de unión corregidos se ajustaron globalmente a un modelo de unión 1:1 (Biacore T200 Evaluation software 2.0, GE Healthcare, Pittsburgh, PA). Los parámetros cinéticos calculados ( $k_{on}$  y  $k_{off}$ ) y  $K_D$  determinada como  $k_{off}/k_{on}$  se muestran en la **Tabla 1**.

**Tabla 1 Cinética de DuetMab e IgG parentales frente a antígenos EGFR y cMET**

|    | Anticuerpo      | Antígeno                  | $K_{on} (M^{-1} s^{-1})$     | $K_{off} (s^{-1})$    | $K_D (nM)$ |
|----|-----------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------|------------|
| 10 | IgG anti-RAA22  | EGFR humano               | $4.41 \times 10^4$           | $2.06 \times 10^{-3}$ | 46.6       |
|    |                 | EGFR de macaco cynomolgus | $3.54 \times 10^4$           | $6.01 \times 10^{-3}$ | 169.8      |
|    |                 | EGFR de ratón             | $4.03 \times 10^4$           | $1.90 \times 10^{-2}$ | 488.0      |
|    |                 | cMET humana               |                              |                       |            |
| 15 | IgG anti-QD6    | cMET de macaco cynomolgus | No se detectó unión a 200 nM |                       |            |
|    |                 | cMET de ratón             |                              |                       |            |
|    |                 | EGFR humano               | $1.48 \times 10^5$           | $2.92 \times 10^{-4}$ | 2.0        |
|    |                 | EGFR de macaco cynomolgus | $1.14 \times 10^5$           | $2.88 \times 10^{-4}$ | 2.5        |
| 20 | IgG anti-B09-57 | EGFR de ratón             | $1.67 \times 10^5$           | $7.35 \times 10^{-4}$ | 4.4        |
|    |                 | cMET humana               |                              |                       |            |
|    |                 | cMET de macaco cynomolgus | ND                           |                       |            |
|    |                 | cMET de ratón             |                              |                       |            |
| 25 | IgG anti-B09-57 | EGFR humano               |                              |                       |            |
|    |                 | EGFR de macaco cynomolgus | No se detectó unión a 200 nM |                       |            |
|    |                 | EGFR de ratón             |                              |                       |            |
|    |                 | cMET humana               | $5.63 \times 10^5$           | $8.82 \times 10^{-4}$ | 1.6        |
| 30 | DuetMab         | cMET de macaco cynomolgus | $1.04 \times 10^6$           | $1.94 \times 10^{-3}$ | 1.9        |
|    |                 | cMET de ratón             | No se detectó unión a 200 nM |                       |            |
|    |                 | EGFR humano               | $4.47 \times 10^4$           | $2.01 \times 10^{-3}$ | 45.0       |

|    |                    |                |                    |                       |       |
|----|--------------------|----------------|--------------------|-----------------------|-------|
| 5  | RAA22/B09-57       | EGFR de macaco |                    |                       |       |
|    |                    | cynomolgus     | $2.78 \times 10^4$ | $5.48 \times 10^{-3}$ | 197.0 |
|    |                    | EGFR de ratón  | $3.54 \times 10^4$ | $2.06 \times 10^{-2}$ | 575.4 |
|    |                    | cMET humana    | $4.43 \times 10^5$ | $9.86 \times 10^{-4}$ | 2.2   |
|    |                    | cMET de macaco |                    |                       |       |
|    |                    | cynomolgus     | $9.74 \times 10^5$ | $2.12 \times 10^{-3}$ | 2.2   |
|    |                    | cMET de ratón  | ND                 |                       |       |
| 10 | DuetMab QD6/B09-57 | EGFR humano    | $6.35 \times 10^4$ | $3.74 \times 10^{-4}$ | 5.9   |
|    |                    | EGFR de macaco |                    |                       |       |
|    |                    | cynomolgus     | $2.10 \times 10^5$ | $5.85 \times 10^{-4}$ | 2.8   |
|    |                    | EGFR de ratón  | $1.26 \times 10^5$ | $7.80 \times 10^{-4}$ | 6.2   |
|    |                    | cMET humana    | $4.25 \times 10^5$ | $6.96 \times 10^{-4}$ | 1.6   |
|    |                    | cMET de macaco |                    |                       |       |
|    |                    | cynomolgus     | $9.58 \times 10^5$ | $2.06 \times 10^{-3}$ | 2.2   |
| 15 |                    | cMET de ratón  | ND                 |                       |       |

<sup>a</sup>ND: no determinado. Las mediciones cinéticas de formas monoméricas solubles de EGFR y cMET se realizaron utilizando un instrumento BIACore.  $K_D$  se calcularon como la relación de  $k_{off}/k_{on}$  de un ajuste no lineal de los datos.

Como puede verse a partir de los datos anteriores, la molécula de anticuerpo biespecífica QD6/B09-57 se une a c-Met humana con alta afinidad ( $\sim 2$  nM  $K_D$ ) y EGFR humano con alta afinidad ( $\sim 6$  nM  $K_D$ ), mientras que la molécula de anticuerpo biespecífica RAA22/B09-57 se une a c-Met humana con una afinidad similarmente alta ( $\sim 2$  nM  $K_D$ ) pero se une a EGFR humano con una afinidad reducida ( $\sim 45$  nM  $K_D$ ) en comparación con QD6/B09-57.

## 2.2 Unión simultánea de DuetMab a EGFR y cMET.

Los estudios de unión simultánea a proteínas EGFR y cMET humanas recombinantes se midieron mediante interferometría de biocapa en un instrumento Octet384 esencialmente como se describe (Mazor, 2015). Brevemente, el antígeno cMET marcado con His a 5  $\mu$ g/ml en tampón de ensayo [PBS pH 7.2, 3 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 0.05 % (v/v) de Tween 20] se capturó inicialmente en biosensores de NI-NTA. Después de un paso de lavado para eliminar cualquier proteína no unida, los respectivos biosensores cargados se sometieron a sucesivas interacciones de asociación y disociación, primero con 66 nM de los anticuerpos y luego con el antígeno EGFR a 500 nM. Las curvas de asociación y disociación se calcularon a partir de un ajuste no lineal de los datos utilizando el software Octet384 v.9.0. Como se muestra en la **FIG. 2** los DuetMab demostraron unión simultánea a ambos antígenos,

mientras que la IgG anti-cMET parental mostró unión específica solo a cMET y las dos IgG anti-EGFR no mostraron unión a los sensores cargados con cMET.

### 2.3 Especificidad de EGFR y c-Met

La especificidad para los parálogos de especies de EGFR y cMET y los miembros de la familia estrechamente relacionados se determinó mediante ELISA. Brevemente, las soluciones de antígeno se prepararon en PBS a 1 µg/ml y se aplicaron 50 microlitros en placas de ensayo ELISA de media área. Las placas se lavaron y bloquearon con BSA al 1 % en PBS que contenía Tween-20 al 0.005 % (PBS-T) durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 4 veces en PBS-T. Como se establece en la **FIG. 3**, los anticuerpos primarios utilizados fueron: R374 (un anticuerpo de control de isotipo IgG1 no vinculante), B09 (anticuerpo anti-cMET), QD6 (anticuerpo anti-EGFR), RAA22 (anticuerpo anti-EGFR), QD6/B09 (DuetMAb de EGFR/c-MET biespecífico), RAA22 /B09 (DuetMAb de EGFR/c-MET biespecífico), PaniX (anticuerpo anti-EGFR), MetMab (anticuerpo anti-cMET) y Mab11311 (anticuerpo anti-HER4). Los pocillos se incubaron con 50 microlitros de los anticuerpos primarios indicados diluidos en PBS-T en una serie de diluciones 1:3, comenzando con 10 µg/ml y finalizando con 0.002 µg/ml, excepto para el control de Acm de unión a HER4, MAB1131, para el cual la serie comenzó en 1 µg/ml. Los pocillos se lavaron 4 veces en PBS-T, luego se añadieron a cada pocillo 50 µl de anticuerpo secundario marcado con HRP de Fab antihumano de cabra, diluido 1:5000 en PBS-T, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se añadieron 50 microlitros de solución de sustrato TMB a todos los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 5-30 min, hasta que se observó una señal intensa en los pocillos de control positivo. Se añadieron 50 microlitros de solución de parada de TMB a todos los pocillos y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas SpectraMax M5. Los datos se analizaron en el software SoftMax Pro 5 y se trazaron utilizando el software de gráficos GraphPad Prism 7.

Para determinar la reactividad cruzada entre especies, se llevaron a cabo ensayos ELISA como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la **FIG. 3A**, la IgG anti-EGFR de alta afinidad, QD6, así como el DuetMAb de EGFR/cMET monovalente biespecífico, QD6/B09, se unieron a EGFR humano, de macaco cynomolgus y de ratón y dieron señales sólidas en el ensayo ELISA. Por el contrario, la IgG anti-EGFR de afinidad reducida, RAA22, se unió más débilmente a EGFR humano, de macaco cynomolgus y de ratón en comparación con QD6. La unión a EGFR de ratón fue débil, pero detectable. El DuetMAb de EGFR/cMET biespecífico monovalente correspondiente, RAA22/B09, mostró una unión aún más débil a EGFR humano y de macaco cynomolgus en relación con la IgG parental bivalente, RAA22, y unión nominal a EGFR de ratón. La IgG anti-cMET, B09, así como todas las variantes

biespecíficas, mostraron una unión comparable a cMET humana y de macaco cynomolgus. No hubo unión detectable de ninguno de los anticuerpos a cMET de ratón. Estos resultados son coherentes con la cinética de unión determinada por las mediciones de resonancia de plasmones superficiales en el instrumento BIAcore (Tabla 1 anterior).

5 Como se muestra en la **FIG. 3B** ninguna de la IgG parentales o los anticuerpos biespecíficos derivados mostró una unión apreciable a ninguna de las proteínas de la familia EGFR HER, HER2, HER3 o HER4. De manera similar, ninguno de los anticuerpos mostró una unión significativa a los miembros de la familia cMET, Ron (CD136) o Semaphorin 3a.

10 Estos resultados demuestran que las IgG parentales y los anticuerpos biespecíficos resultantes se unen específicamente a sus dianas afines, sin unión detectable a especies familiares estrechamente relacionadas.

**EJEMPLO 3: Supervisión de la internalización y el tráfico de anticuerpos hacia compartimentos acidificados utilizando un tinte sensible al pH**

15 La eficacia de los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) se basa en parte en la capacidad del anticuerpo para mediar en la internalización y la administración eficientes a los lisosomas, donde el anticuerpo se degrada posteriormente. Esta degradación lisosomal libera así la ojiva citotóxica y le permite ejercer sus efectos celulares sobre las células tumorales diana. Por otra parte, la expresión de la diana en tejidos normales, no tumorales puede dar lugar a toxicidades que reducen la ventana terapéutica del ADC. El diseño de los anticuerpos

20 biespecíficos de la presente divulgación pretende minimizar el impacto del ADC en tejidos normales que exhiben poca o ninguna coexpresión de las dianas mientras maximiza la administración del ADC a las células tumorales que coexpresan las dos dianas. Para evaluar si el direccionamiento dual usando el anticuerpo biespecífico de afinidad reducida a EGFR, RAA22/B09, proporcionó una ventaja de selectividad en relación con la interacción de una sola

25 diana, se llevó a cabo estudios usando anticuerpos marcados con colorantes sensibles al pH para comparar la eficiencia de internalización del Acm biespecífico frente a los anticuerpos parentales monovalentes que comprenden el biespecífico.

30 La visualización de la internalización y el tráfico de anticuerpos hacia los compartimentos intracelulares acidificados, como los lisosomas y los endosomas, se facilitó utilizando anticuerpos marcados con colorante sensible al pH pHAb (Promega). Este colorante exhibe una fluorescencia muy baja a pH > 7, pero se vuelve fuertemente fluorescente a pH ácido, alcanzando un máximo aproximadamente a pH 5. Brevemente, los anticuerpos se marcaron con colorante reactivo de amina pHAb, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los anticuerpos que se marcaron fueron: Control de isotipo IgG1 R347, anticuerpos

35 de control biespecíficos monovalentes, anticuerpo anti-EGFR RAA22/R347 y anti-cMET

B09/R347, así como anticuerpo biespecífico monovalente de EGFR/cMET RAA22/B09. Se sembraron en placa células de cáncer de pulmón NCI-H1975, que coexpresan niveles modestos de EGFR (densidad relativa de receptor ~33,000) y cMET (densidad relativa de receptor ~50,000), en placas de ensayo de 96 pocillos de paredes negras y fondo transparente en volúmenes de 100 microlitros en una densidad de  $2 \times 10^5$  células/ml en medio de crecimiento RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10 %. Las placas se cultivaron en una incubadora humidificada durante la noche a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub>. A continuación, las placas se enfriaron en hielo durante 30 minutos antes de la adición de anticuerpos de control biespecíficos y monovalentes marcados con pHAb a diversas concentraciones en medio de crecimiento previamente enfriado. Los cultivos se enfriaron en hielo durante otros 30 minutos y luego se leyó la fluorescencia en un sistema de formación de imágenes de alto contenido Operetta usando el filtro Cy3 y esta lectura inicial se designó como tiempo cero. Las placas se movieron nuevamente a la incubadora a 37 °C y se tomaron lecturas adicionales a las 3, 6, 24, 30 y 48 horas.

En la **FIG. 4** se muestra un experimento de internalización representativo que utiliza Acm marcados con pHAb a 1.25 µg/ml para tratar células NCI H1975. El anticuerpo de control de isotipo de IgG1 de no unión, R347, no mostró fluorescencia detectable en ningún momento. El anticuerpo biespecífico de EGFR/cMET, RAA22/B09, mostró fluorescencia intracelular a las 3 horas y la intensidad de la fluorescencia siguió aumentando hasta 48 horas después del tratamiento. El anticuerpo monovalente de control de unión a EGFR, RAA22/R347, mostró una fluorescencia muy débil a partir de las 24 horas, que no aumentó drásticamente a las 48 horas. El anticuerpo monovalente monoespecífico de control de unión a cMET, B09/R347, mostró una modesta fluorescencia a las 24 horas, aumentando aún más a las 48 horas. Sin embargo, la intensidad de la señal fluorescente del anticuerpo anti-cMET monoespecífico fue modesta en comparación con el biespecífico RAA22/B09, lo que sugiere que el anticuerpo biespecífico tiene una mayor eficiencia de internalización que el anticuerpo parental monoespecífico en la línea celular que expresa la doble diana sometida a prueba en este caso. Cuando las células se trataron con Acm marcados con pHAb a 0.625 µg/ml, la diferencia entre el anticuerpo biespecífico y controles monoespecíficos fue aún más sorprendente (**FIG. 5**). Los anticuerpos monoespecíficos mostraron muy poca fluorescencia, incluso a las 48 horas, mientras que el anticuerpo biespecífico RAA22/B09 volvió a mostrar fluorescencia intracelular a las 3 horas y la intensidad de la fluorescencia siguió aumentando hasta 48 horas después del tratamiento. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que el anticuerpo biespecífico de direccionamiento dual media la internalización eficiente en células que coexpresan tanto EGFR como cMET. Al mismo tiempo, los anticuerpos parentales

monoespecíficos muestran una absorción e intensidad de fluorescencia reducidas en comparación con el anticuerpo biespecífico. Una extensión lógica de estas conclusiones es sugerir que el anticuerpo biespecífico podría comportarse más como los anticuerpos monoespecíficos en tejidos que expresan solo uno pero no ambas dianas, lo que generalmente es cierto para EGFR y cMET. Cabe destacar que el Acm de control anti-EGFR de baja afinidad marcado con pHAb, RAA22/R347, mostró una absorción y fluorescencia insignificantes. Esta unión reducida a EGFR podría minimizar el impacto del ADC en tejidos normales, como la piel, que expresan niveles significativos de EGFR pero poco o nada de cMET.

#### 10 EJEMPLO 4 – Supervisión de la internalización de anticuerpos usando microscopía confocal

Cinética de internalización de DuetMab marcados: Se evaluaron los anticuerpos RAA22/B09 y QD6/B09 *in vitro* usando microscopía de fluorescencia confocal de células vivas.

##### 4.1 Materiales y métodos

Las células H1975 y HCC827 eran de ATCC. RAA22/B09, QD6/B09 y los derivados de un solo brazo eran de MedImmune. QD6/B09 y los controles específicos de un solo brazo QD6/IgG y B09/IgG, con brazos de Fab de IgG que se derivaron de la IgG1 humana no específica NMGC eran de MedImmune. RAA22/B09 y los controles específicos de un solo brazo RAA22/IgG y B09/IgG derivados de la IgG1 humana no específica R347 eran de MedImmune. RPMI (11875–093), HEPES (15630106), piruvato de sodio (11360070), kits de marcado de anticuerpos monoclonales AlexaFluor® 647 (A-20186), columnas de desalinización giratoria Zeba™ (87767) y CellTracker™ Blue CMAC (C2110) fueron de Life Technologies (Carlsbad, CA). La solución de desprendimiento de células Accutase (423201) era de BioLegend (San Diego, CA). El suero fetal bovino inactivado por calor HyClone (SH30071.03HI) era de GE Life Sciences (Marlborough, MA). PBS (21-040) era de Corning Incorporated (Corning, NY). El reactivo de bloqueo de FcR (130-059-901) era de Miltenyi Biotec Inc. (Auburn, CA). Los tubos de fondo redondo de polipropileno (352063) eran de BD Biosciences (San Jose, CA). Las microplacas CellCarrier de 384 pocillos eran de PerkinElmer Inc. (n.º de cat. 6007550, Waltham, MA).

##### Preparación de conjugados de AlexaFluor

30 Los anticuerpos monoclonales se conjugaron con colorantes AlexaFluor-647 utilizando los kits de marcado de anticuerpos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se incubaron 50-100 microgramos de un anticuerpo en el tampón bicarbonato de sodio, pH = 8.3, con reactivos de colorantes reactivos con agitación suave a temperatura ambiente durante 1 h. Los colorantes no incorporados se eliminaron mediante cromatografía

de exclusión por tamaño utilizando columnas de desalinización giratorias Zeba™ con 40K MWCO equilibradas con 1X PBS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Cultivo y preparación de células para tinción

Se cultivaron células adherentes H1975 o HCC827 en matraces T-75 en incubadoras de CO<sub>2</sub> utilizando medios RPMI-1640 que contenían suero fetal bovino (FBS) al 10 % hasta una confluencia del 80-90 % después de la siembra inicial. El día del experimento, las monocapas adherentes cultivadas en matraces T-75 se disociaron en suspensión celular usando Accutase. Las células separadas se lavaron dos veces con 1x PBS usando centrifugación a 300xg durante 5 min. A continuación, las células se resuspendieron en RPMI sin fenol a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml y se usaron para la tinción.

#### Tinción celular para obtención de imágenes

La suspensión celular a  $2 \times 10^6$  células/ml se incubó durante 30 min con CellTracker™ Blue CMAC 1  $\mu$ M preparado en RPMI sin fenol a 37 °C en la incubadora de CO<sub>2</sub>. El colorante CellTracker™ Blue CMAC no incorporado se eliminó mediante dos lavados con RPMI sin fenol usando centrifugación a 300xg durante 5 min a 4 °C. A continuación, las células se enfriaron en hielo y se bloquearon con 10  $\mu$ l de reactivo de bloqueo de FcR por  $1 \times 10^6$  células durante 15 minutos.  $2 \times 10^5$  células se dividieron en alícuotas en tubos de fondo redondo de 5 ml y se incubaron con anticuerpos fluorescentes a una concentración final de 2.5  $\mu$ g/ml. Después de eliminar los reactivos fluorescentes no unidos mediante centrifugación a 4 °C, las células se resuspendieron en RPMI sin fenol que contenía HEPES 100 mM, piruvato de sodio 1 mM y FBS al 1 %. Las células se transfirieron a múltiples pocillos de una placa de obtención de imágenes de 384 pocillos a una densidad de 50,000 células por pocillo y se centrifugaron brevemente a 2200 rpm durante 2 min a 4 °C antes de la adquisición de imágenes.

#### Adquisición de imágenes celulares usando microscopía de fluorescencia confocal

Las células teñidas en placas de imágenes (formato de 384 pocillos) se sometieron a obtención de imágenes en un sistema de obtención de imágenes de fluorescencia confocal Opera como se describió anteriormente (Vainshtein, 2015) o se transfirieron a un microscopio invertido Zeiss Axio Observer.Z1 con objetivo 40X/1.2NA LCIPlan Apo (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY). Para los experimentos que usan el microscopio Zeiss, el entorno de obtención de imágenes se mantuvo a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub> y un 70 % de humedad utilizando una incubadora XLmulti S DARK (PeCon GmbH, Erbach, Alemania). Las muestras se iluminaron con láseres de estado sólido de 405, 488, 561 y 63 nm (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY). Se adquirió una serie de imágenes en los momentos indicados utilizando una unidad de disco giratorio Yokogawa CSU-X1 (Yokogawa Electric Corporation, Tokio, Japón) con Evolve 512 EMCCD (Photometrics, Tuscon, AZ). Antes de la adquisición de

imágenes, los parámetros de exposición, como la potencia del láser, los tiempos de exposición, la ganancia de la cámara, etc., se determinaron utilizando una alícuota de las células teñidas. Las imágenes se procesaron usando ZEN 2.3 (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY) y se analizaron usando el software Columbus (PerkinElmer, Waltham, MA).

#### 5 Algoritmo para análisis de imagen de internalización

El algoritmo utilizado para la cuantificación de la internalización de anticuerpos se describió anteriormente (Vainsthein, 2015), con las siguientes actualizaciones y modificaciones. El canal de referencia utilizado para el procesamiento iterativo de imágenes se originó a partir de la tinción de células con CellTracker™ Blue CMAC (CTB). El canal de señal  
 10 aún se deriva de los canales de anticuerpos-AlexaFluor-647 de los generadores de imágenes. El algoritmo procesó las imágenes utilizando parámetros definidos por el algoritmo, que inicialmente se establecieron como valores predeterminados y luego se optimizaron para cada tipo de célula y experimento. La tinción con CTB de la imagen se usó para identificar las células usando umbralización para detectar una región en la imagen que tenía una intensidad  
 15 más alta que su entorno, excluyendo áreas con señales de intensidad de fluorescencia por debajo del umbral. Los objetos de la célula restantes identificados se designaron como "Célula total". Las células se seleccionaron adicionalmente filtrando en el área de propiedades morfológicas (objetos entre 120-600  $\mu\text{m}^2$ ) y redondez ( $> 0.5$ ). A continuación, se construyeron la "Región de la membrana" y la "Región del citoplasma" en las células aceptadas alrededor  
 20 de los límites del objeto utilizando parámetros definidos por el algoritmo. La intensidad de la fluorescencia en cada región se usó para supervisar las señales de AlexaFluor-647 asociadas con anticuerpos. Las intensidades de fluorescencia de cada región se informaron como la media de la suma de todos los píxeles en las células aceptadas.

Se utilizó la acumulación de fluorescencia asociada a anticuerpos en el citoplasma  
 25 para cuantificar la cinética de internalización de anticuerpos. Para garantizar la comparabilidad de los resultados debido a la variabilidad en la tinción celular y la intensidad de la fluorescencia, las señales citoplásmicas se normalizaron por la señal de célula total en cada punto de tiempo y se designaron como Fracción internalizada utilizando la ecuación: Fracción internalizada = Intensidad (citoplasma)/(Intensidad (citoplasma) + Intensidad (membrana)). Las  
 30 constantes de tasa de internalización  $k_{\text{int}}$  se calcularon a partir del transcurso del tiempo de internalización ajustando la curva de los datos usando la ecuación:  $F_{\text{cit}}(t) = (1 - e^{-k_{\text{int}} \cdot t}) \cdot F_{\text{máx,cit}}$ , donde  $F_{\text{máx,cit}}$  es la relación máxima entre la intensidad citoplasmática por célula y la intensidad total por célula. El ajuste de la curva de los datos se realizó utilizando Graphpad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA). La vida media de internalización ( $T_{1/2}$ ) se calculó  
 35 como la relación de  $\ln(2)$  y  $k_{\text{int}}$ .

#### 4.2 Internalización *in vitro* de RAA22/B09 y QD6/B09

Cinética de internalización de DuetMab con marcado primario con AlexaFluor647 (AF647): Se evaluaron los anticuerpos RAA22/B09 y QD6/B09 *in vitro* usando la línea celular que expresa EGFR y c-MET, H1975. Cada anticuerpo se unió previamente a las células y luego se supervisó la translocación del anticuerpo desde la superficie celular al citoplasma usando microscopía de fluorescencia confocal de células vivas. La **FIG. 6** muestra ambos anticuerpos localizados principalmente en la superficie celular antes ( $T=0$ ) de someterse a condiciones de internalización y se translocaron al área del citoplasma (azul) después de 1 hora ( $T=1$  h). Se tomaron imágenes cinéticas cada 5 minutos durante el transcurso del tiempo de internalización y se procesaron usando un algoritmo cuantitativo (ver arriba) para determinar las constantes cinéticas de internalización y los tiempos medios. La **FIG. 6b** muestra una cinética de internalización muy comparable para QD6/B09 y RAA22/B09 con semitiempos de  $37.5 \pm 10.6$  min y  $43.2 \pm 15.5$ , respectivamente.

Para evaluar el modo de internalización de anticuerpos e investigar la contribución de cada brazo a la internalización general de los DuetMab, se evaluó la internalización de moléculas de anticuerpos control específicas de un solo brazo, QD6/IgG y B09/IgG, contra el dúo QD6/B09, y RAA22/IgG y B09/IgG contra el dúo RAA22/B09 en células H1975, que expresan tanto EGFR como c-MET. Dado que solo un brazo es específico para el receptor objetivo, el anticuerpo de control solo puede internalizarse a través de un receptor, lo que elimina el direccionamiento del receptor dual y el entrecruzamiento como modo de internalización.

Perfiles de internalización de QD6/B09 (**FIG. 7A**) y RAA22/B09 (**FIG. 7B**) generaron patrones muy similares de disminución congruente de las señales de mAb-FI647 de membrana con el aumento respectivo de las señales de mAb-AF647 en el citoplasma, un perfil típico para la internalización. Sin embargo, sus construcciones de un solo brazo mostraron perfiles de internalización muy diferentes. QD6/IgG de un solo brazo tuvo un transcurso de tiempo de internalización casi idéntico al de DuetMab QD6/B09 (**FIG. 7A**, izquierda y centro), lo que indica que la internalización del dúo QD6/B09 fue impulsada principalmente por el brazo de EGFR de la molécula con una contribución mínima del brazo B09. De hecho, la construcción B09/IgG mostró un nivel muy pequeño de internalización (**FIG. 7B**, derecha). La disminución rápida y extensa de la señal de la membrana correspondió a un aumento muy moderado de la señal del citoplasma, probablemente debido a la disociación extensa de B09/IgG preunido del receptor c-MET en la superficie celular. La disociación del anticuerpo dio como resultado posteriormente la modesta internalización de B09/IgG. Estos resultados

revelaron que la internalización del dúo QD6/B09 fue impulsada principalmente por el brazo de EGFR de la molécula con una contribución mínima del brazo de B09.

Por el contrario, DuetMab RAA22/B09 mostró perfiles de internalización muy diferentes en comparación con sus anticuerpos de control de un solo brazo. Tal como se observa en la **FIG. 7B**, los valores de intensidad citoplasmática fueron 10.98 y 4.70 veces mayores para DuetMab RAA22/B09 que para RAA22-IgG y B09-IgG, respectivamente. Si bien la internalización ineficiente de B09/IgG puede atribuirse a su pronunciada disociación (discutida anteriormente), RAA22/IgG experimentó una rápida internalización. Sin embargo, debido a la menor afinidad del brazo de EGFR, el número de moléculas RAA22/IgG fue 10.98 veces menor (basado en la intensidad de fluorescencia) que para el DuetMab RAA22-B09. El aumento marcado de la cantidad de Acm doble RAA22/B09 que entra en el citoplasma en comparación con las construcciones de un solo brazo demostró que ambos brazos del anticuerpo deben interactuar con los receptores diana para impulsar la internalización. Este hallazgo muestra que los DuetMab QD6/B09 y RAA22/B09 tienen diferentes mecanismos de internalización, con QD6/B09 impulsado principalmente por el brazo de EGFR pero requiriendo RAA22/B09 ambos brazos de EGFR y c-MET para la interacción.

#### *4.3 Internalización de RAA22/B09 en líneas celulares con diferentes niveles de receptores diana*

Dado que la unión de los brazos EGFR y c-MET al receptor diana promovió la internalización del receptor RAA22/B09 en las células H1975, se examinó si el mayor número de receptores EGFR y c-MET afectaría a las propiedades de internalización. Los niveles de receptor respectivos determinados por inmunotransferencia de tipo Western fueron ~33,000 para EGFR y ~50,000 para c-MET en células H1975 y ~790,000 para EGFR y ~523,000 para c-MET en células HCC827. Los perfiles de internalización de RAA22/B09 en células H1975 (receptor medio) y HCC827 (receptor alto) muestran un aumento marcado de la internalización en células HCC827 (**FIG. 8**).

Como se esperaba en correspondencia con los aumentos respectivos de 23.9 y 10.4 veces de los niveles generales de RAA22/B09 anti EGFR y c-MET, la unión a células HCC827 fue en promedio 8.9 veces mayor que H1975 ( $T=0$ ,  $3.1 \times 10^7$  IMF versus  $3.5 \times 10^6$  IMF). Los niveles de internalización (a juzgar por la intensidad citoplásmica máxima) fueron 21.7 veces más altos en las células HCC827, lo que sugiere que concentraciones significativamente más altas de anticuerpos entran en el citoplasma en células que expresan niveles altos de receptores diana. Es importante destacar que, además de las intensidades marcadamente diferentes, los perfiles de internalización (señales de membrana y citoplasma a lo largo del tiempo) también fueron significativamente distintos entre las células HCC827 y H1975. En

células HCC827 de alta expresión, la disminución de la señal de membrana de RAA22/B09-AF647 correspondió al aumento recíproco de la señal de citoplasma de RAA22-B09, con la señal de RAA22/B09 total mantenida a lo largo del tiempo, lo que indica una fuerte interacción del anticuerpo de doble brazo con ambos receptores y la posterior internalización. En las células H1975, hubo una disminución simultánea de la intensidad total y de la membrana, lo que indica que las porciones del anticuerpo preunido podrían haberse disociado de la superficie celular y no haberse internalizado dentro de la célula. Se observaron perfiles similares indicativos de disociación para la internalización de RAA22/IgG y B09/IgG en células HCC827, donde la interacción de un solo brazo no produjo una unión efectiva y era propenso a la disociación (**FIG. 9A y B**). Estos datos sugirieron que el modo mixto de interacción del receptor (interacción de un solo brazo y de dos brazos) está presente cuando RAA22/B09 se somete a internalización en células H1975. Juntos, estos datos sugieren que los niveles de expresión del receptor de la célula diana son un determinante importante del alcance y la eficiencia de la internalización de RAA22/B09.

#### 15 EJEMPLO 5 – Conjugación a tubulisina AZ1508

##### 5.1 *Conjugación específica del sitio*

La conjugación del fármaco de tubulisina con la molécula de anticuerpo RAA22/B09 se llevó a cabo esencialmente como se describió previamente en Thompson, 2016 y el documento US20150291657A1.

##### 20 5.2 *Evaluación de la capacidad de desarrollo*

La capacidad de desarrollo se evaluó tanto para el producto intermedio DuetMAb no conjugado (DuetMAb de cMet-EGFR, RAA22-B09) como para el conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) que consiste en el DuetMAb conjugado con 2 moléculas de tubulisina AZ1508. La evaluación de la capacidad de desarrollo del ADC de EGFR-cMET y tubulisina comprendió la evaluación de las responsabilidades de secuencia, la estabilidad, las propiedades bioquímicas/biofísicas y la capacidad de preparación.

##### Responsabilidades de secuencia

Se evaluó la secuencia de aminoácidos de RAA22-B09 para determinar la presencia de responsabilidades conocidas, incluidos los sitios de desamidación, los sitios de oxidación y los sitios de glicosilación introducidos en la región CDR. El análisis no reveló ninguna responsabilidad de secuencia que se considerara de alto riesgo.

##### Estabilidad

Se realizaron estudios de estabilidad para el producto intermedio de Acm RAA22-B09 a una concentración de 50 mg/ml en histidina 20 mM, sacarosa 240 mM, pH 6.0, y para el

conjugado ADC a 5 mg/ml en histidina 20 mM, sacarosa al 7 %, pH 6.0. El material se envasó en botellas de HDPE.

El material se sometió a prueba después de someterse a 3 ciclos de congelación y descongelación (desde -80 °C hasta temperatura ambiente) y después de la incubación a 5 °C, 25 °C y 40 °C.

Las muestras se analizaron después de 1 mes; para materiales almacenados a 5 °C y a 25 °C también después de 2 meses.

Se observaron partículas visibles para el producto intermedio de Acm. Sin embargo, estas partículas se consideraron de bajo riesgo de desarrollo y se pueden eliminar fácilmente mediante filtración antes de la conjugación. Los ADC permanecen prácticamente libres de partículas visibles.

No se observaron cambios en el transcurso de los estudios de estabilidad de ADC a 5 °C, 25 °C y 40 °C. No se observó ningún aumento en el contenido de fármaco libre.

Se observaron cambios mínimos en la pureza del monómero después del almacenamiento a 5 °C y a 25 °C tanto para el producto intermedio de Acm como para el ADC.

El ADC retuvo la actividad citotóxica después de la incubación a las temperaturas indicadas durante 4 semanas. Se concluyó que el ADC presenta una buena estabilidad térmica.

## 20 Propiedades bioquímicas/biofísicas

La temperatura de fusión térmica del producto intermedio de Acm y ADC se determinó mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC). Se encontró que la conjugación no disminuye significativamente la temperatura de fusión. Se observa una población homogénea después de la conjugación.

En conclusión, el producto intermedio de Acm anti cMET-EGFR (RAA22-B09-Maia) y el ADC correspondiente con carga útil de AZ1508 se consideraron de bajo riesgo con respecto a la capacidad de desarrollo.

### *5.3 Análisis de estabilidad ex vivo de RAA22/B09-AZ1508 en suero de rata, de ratón y de macaco cynomolgus*

RAA22/B09-AZ1508 se diluyó en suero de rata, ratón y macado cynomolgus filtrado 0.2 µM hasta una concentración final de 200 µg/ml y se incubaron a 37 °C durante cero, uno, tres y siete días. Las perlas de sefarosa activadas por NHS (GE Healthcare) se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS; pH 7.4), mediante centrifugación a 1 x 1000 g durante un minuto, para eliminar la solución de almacenamiento de isopropanol. Se añadió una décima parte del volumen de bicarbonato de sodio (1 M [v/v]) a la proteína EGFR-

ECD recombinante (2.12 mg/ml, n.º de lote: C20202OCT14C) y 6 ml de esta mezcla se incubaron con 3 ml de perlas de sefarosa activadas con NHS lavadas. La mezcla de perlas se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Las perlas se lavaron tres veces con 1X PBS (pH 7.4) para eliminar el EGFR no unido. Se determinó que la eficiencia de inmovilización era del 93 % comparando la cantidad de EGFR unido frente a la cantidad inicial usando una HPLC Agilent serie 1200 y una columna de cromatografía por exclusión de tamaño Tosoh Bioscience TSKgel G3000 siguiendo las recomendaciones del fabricante. RAA22/B09-AZ1508 se recuperó del suero incubando 100 µl de la mezcla incubada de suero de RAA22/B09-AZ1508 con 50 µl de perlas de EGFR durante 30 minutos a temperatura ambiente; seguido de tres lavados secuenciales con tampón 1X PBS y elución con 100 µl de tampón de elución de anticuerpos (tampón de elución de IgG; Thermoscientific). El eluyente se analizó mediante rLCMS para calcular la cantidad restante de ADC intacto. Utilizando espectrometría de masas de fase inversa reducida (rLCMS) en una HPLC Agilent serie 1290 acoplado a un LC/MS TOF de masa exacta Agilent 6520 con una fuente de ionización por electropulverización, el ADC restante se calculó utilizando la intensidad de altura máxima obtenida mediante la adquisición de datos Agilent the MassHunter y software de procesamiento de cromatogramas. Se cargaron aproximadamente 2 µg (35 µl) de eluyente reducido en una columna Poroshell 300SB-C3 (2.1 × 75 mm, 255 Agilent) y se eluyó a una velocidad de flujo de 0.4 ml/min usando un gradiente escalonado del 60 % de B después de 6 minutos 256 (disolvente A: 0.1 % de ácido fórmico en agua; disolvente B: 0.1 % de ácido fórmico en acetonitrilo). La intensidad de la altura máxima de las especies de ADC intactas conjugadas y no conjugadas o modificadas se usó para calcular el porcentaje de ADC restante dividiendo la intensidad de la altura máxima del conjugado intacto entre la intensidad de la altura máxima total de las especies de ADC. Los resultados se muestran en la **Tabla 2** a continuación.

**Tabla 2**

% de conjugación después de la incubación con suero    % de desacetilación después de la incubación con suero

|          | RAA2/BO9-Maia-AZ1508 |      |      | RAA2/B089-Maia-AZ1508 |      |      |
|----------|----------------------|------|------|-----------------------|------|------|
|          | Ratón                | Rata | Cyno | Ratón                 | Rata | Cyno |
| Tiempo 0 | 93%                  | 93%  | 92%  | 3%                    | 4%   | 3%   |
| Día 1    | 91%                  | 91%  | 91%  | 7%                    | 12%  | 8%   |
| Día 3    | 90%                  | 86%  | 86%  | 15%                   | 40%  | 36%  |
| Día 7    | 84%                  | 83%  | 84%  | 40%                   | 41%  | 37%  |

Estos datos muestran la tasa de desconjugación de toda la carga útil del ADC y el metabolismo del ADC mediante la liberación del grupo O-acetilo de la ojiva de tubulisina en suero de ratón, rata y macaco cynomolgus, *ex vivo*. Los resultados demuestran que hay una

pérdida menor o igual al 10 % de la carga útil conjugada después de una semana a 37 °C cuando se incubaba con sueros de cualquiera de las tres especies. La tasa inicial de des-O-acetilación de la ojiva de tubulisina del ADC parece diferir ligeramente entre las tres especies, pero la cantidad de des-O-acetilación en el día 7 es similar para las tres especies, alrededor del 40 %.

#### EJEMPLO 6 – Citotoxicidad de ADC *in vitro*

En este ejemplo la potencia *in vitro* de los ADC biespecíficos de EGFR/cMET se midió en un panel de líneas de células cancerosas.

##### 6.1 Caracterización cuantitativa FACS del panel de líneas celulares

Se llevó a cabo FACS para cuantificar la densidad relativa de EGFR y c-Met en las líneas celulares sometidas a prueba.

#### Marcado de anticuerpos

Los anticuerpos purificados PanIX, anti-EGFR-cMet y R347 se marcaron con el kit de marcado de anticuerpos monoclonales Alexa Fluor 647 según las instrucciones del fabricante (Invitrogen n.º de catálogo A20186). La concentración de anticuerpos y la relación de fluorocromo a proteína (F:P) se calcularon utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

#### Citometría de flujo

Las células se recogieron y se lavaron hasta obtener una única suspensión celular. El número de células y la viabilidad celular ( $\geq 90$  %) se determinaron mediante el analizador Vi-Cell XLR (Beckman Coulter). La concentración celular se ajustó a  $5 \times 10^6$  células/ml en tampón FACS enfriado con hielo (solución salina tamponada con fosfato, pH 7.4, FBS al 5 %, azida sódica al 0.1 %) y se sembró en una placa de poliestireno con fondo en U de 96 pocillos, a 250 000 células/ bien. Los anticuerpos conjugados con Alexa 647 se diluyeron en serie en tampón FACS frío a varias concentraciones (0.15-40  $\mu\text{g/ml}$ ) por duplicado para proporcionar una curva de unión. Las células y los anticuerpos primarios se incubaron en hielo húmedo durante 20 minutos en la oscuridad. Las células se lavaron 2 veces con tampón FACS frío y se fijaron en 200  $\mu\text{l}$  de paraformaldehído (PFA) al 2% enfriado con hielo. Para la adquisición de datos, la excitación y emisión de Alexa 647 es de 650/668 nm a través del láser rojo de 640 nm. Veinte mil acontecimientos de cada muestra fueron recolectados por una máquina Becton-Dickenson LSR II con software FACSDiva™. Los resultados se analizaron utilizando el software FlowJo.

### Análisis de EGFR, EGFR-cMet; MESF cuántico (moléculas de fluorocromo soluble equivalente)

La cantidad de EGFR, EGFR-cMet en las células se evaluó empleando microesferas Quantum Alexa Fluor 647 MESF (n.º de catálogo 647C, Bangs Laboratories). Se adquirieron 10,000 acontecimientos por muestra (LSRII), utilizando la misma configuración de citometría de flujo que las muestras enumeradas anteriormente. Se usó el programa QuickCal ([www.bangslabs.com](http://www.bangslabs.com)) para establecer una curva estándar que relaciona el valor del canal con la intensidad de fluorescencia en unidades MESF. La intensidad de fluorescencia media (MFI) es directamente proporcional a la cantidad de fluorocromo presente para calcular el número de moléculas por célula. El MESF calculado a partir del programa Quickcal se divide entre la relación F:P del anticuerpo para obtener la ABC (capacidad de unión del anticuerpo) corregida.

#### 6.2 Métodos para determinar la actividad citotóxica del ADC

La actividad citotóxica de ADC se probó en múltiples líneas celulares tal como sigue. Las células se sembraron en placa a una densidad de 10,000 células por pocillo de placas de 96 pocillos en un volumen de 100 µl en sus medios de cultivo recomendados suplementados con suero bovino fetal al 10 %. Se preparó una concentración 3X de cada dosis de anticuerpo a ensayar mediante dilución en serie de la reserva de anticuerpos en medio de cultivo. Cincuenta microlitros de cada artículo de prueba se añadieron a las células por triplicado de manera que la concentración final de anticuerpos osciló entre 60 nM y 0.0009 nM. Las células tratadas se cultivaron durante 72 horas a 37 grados C en una incubadora humidificada. La actividad metabólica se determinó utilizando el ensayo de viabilidad luminiscente CellTiter-Glo de Promega según las instrucciones del fabricante. Los datos se representaron como porcentaje de actividad metabólica en relación con el control no tratado. Los valores de  $CI_{50}$  se determinaron utilizando un análisis de regresión logística no lineal entre la viabilidad máxima (células no tratadas) y la respuesta máxima (inhibición máxima) con el software GraphPad Prism.

#### 6.3 Resultados – actividad de ADC *in vitro* en el panel de líneas celulares

La potencia *in vitro* de los ADC biespecíficos de EGFR/cMET se midió en un panel de líneas de células cancerosas utilizando el ensayo de viabilidad luminiscente CellTiter-Glo. Como se muestra en la **Tabla 3**, tanto el QD6/B09-AZ1508 de mayor afinidad como el RAA22/B09-AZ1508 de menor afinidad exhibieron una amplia actividad por líneas celulares con un intervalo de niveles de expresión diana.

**Tabla 3 - Actividad *in vitro* de ADC de DuetMAb de EGFR-cMET**

| Línea | Densidad | Densidad | ADC de alta afinidad | ADC de EGFR de |
|-------|----------|----------|----------------------|----------------|
|-------|----------|----------|----------------------|----------------|

| 5  | celular                         | relativa de<br>EGFR | relativa de<br>cMET | QD6/B09-AZ1508 |                           | afinidad reducida<br>RAA22/B09-AZ1508 |                           |
|----|---------------------------------|---------------------|---------------------|----------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
|    |                                 |                     |                     | CI50<br>(pM)   | Máx<br>% de<br>inhibición | CI50<br>(pM)                          | Máx<br>% de<br>inhibición |
| 10 | HCC 827<br>Parental             | 1, 513, 899         | 236, 933            | 96             | 79%                       | 132                                   | 55%                       |
|    | NCI<br>H596                     | 938,023             | 28,353              | 274            | 54%                       | 3,237                                 | 67%                       |
|    | HCC 827<br>GR Pool              | 760, 040            | 523, 298            | 33             | 66%                       | 168                                   | 59%                       |
| 15 | A549                            | 88, 385             | 16, 483             | 118            | 45%                       | 667                                   | 36%                       |
|    | NCI<br>H1792                    | 63,820              | 20,658              | 81             | 80%                       | 200                                   | 81%                       |
|    | NCI<br>H1975                    | 33, 086             | 50, 339             | 178            | 65%                       | 255                                   | 65%                       |
| 20 | NCI<br>H292                     | 96,538              | 16,497              | 91             | 79%                       | 271                                   | 62%                       |
|    | A427                            | 20,236              | 9,734               | 6,959          | 12%                       | 40,220                                | 58%                       |
|    | NCI<br>H358                     | 15,065              | 16,429              | 168            | 29%                       | 3,017                                 | 30%                       |
| 25 | NCI H23                         | 9,843               | 21,669              | >60,000        | ~5%                       | 8,096                                 | 46%                       |
|    | NCI<br>H661<br>(Ag<br>negativa) | ND – 9,906          | ND - 8, 114         | >60,000        | 0                         | >66,667                               | 10%                       |

En general, el ADC con afinidad reducida por EGFR mostró una potencia comparable, aunque algo reducida, en una amplia gama de líneas celulares que coexpresan cantidades significativas tanto de EGFR como de cMET. Generalmente, ambos ADC mostraron una potencia reducida cuando una o la otra diana tenía una densidad de receptor relativa baja en

la superficie celular de aproximadamente 15,000 o menos. Este efecto fue más pronunciado con la variante de afinidad reducida, que parecía más sensible a niveles más bajos de cMET.

**EJEMPLO 7 – Experimentos de prueba de concepto (POC) *in vitro* de citotoxicidad de ADC**

Para probar aún más la hipótesis de que se requiere la interacción biespecífica del anticuerpo anti-EGFR-cMET de afinidad reducida para la administración óptima de ADC, se realizó experimentos *in vitro* para determinar la contribución relativa de los brazos de anticuerpos individuales a la actividad del ADC biespecífico. En el primer experimento, se usó un exceso de anticuerpos parentales desarmados para bloquear EGFR o cMET y luego se midió la actividad del ADC biespecífico de EGFR-cMET en un ensayo de citotoxicidad *in vitro*. Para este experimento, se usó una línea celular que expresa niveles moderados de EGFR y cMET en cantidades aproximadamente iguales. Si los brazos individuales del ADC biespecífico funcionan de forma independiente para administrar el ADC, se esperaría que el bloqueo de cualquier diana en esta línea celular redujera solo modestamente la actividad del ADC, desplazando la  $CI_{50}$  por el doble o menos, ya que las dianas están presentes en niveles similares. Si, por otro lado, el ADC requiere una interacción de diana dual para administrar de manera eficaz el ADC en las células, es probable que el bloqueo de cualquier diana tenga un mayor impacto en la actividad del ADC biespecífico. En un experimento relacionado, se comparó la actividad del ADC de EGFR-cMET biespecífico con anticuerpos control monoespecíficos monovalentes compuestos por un brazo de unión a EGFR o cMET y un brazo de control de anticuerpo de isotipo de no unión. De manera similar, si cada brazo funciona de forma independiente, el resultado esperado sería que cada ADC control monoespecífico sería solo ligeramente menos potente que el ADC biespecífico, y la diferencia sería aditiva. Alternativamente, si los dos brazos del biespecífico funcionan sinérgicamente, se esperarían mayores diferencias en la actividad del ADC biespecífico en comparación con los anticuerpos control monoespecíficos.

**7.1 Métodos**

La actividad citotóxica de los ADC se sometió a prueba en la línea celular NCI-H1975 tal como sigue. Las células se colocaron en placa a una densidad de 10,000 células por pocillo de placas de 96 pocillos en un volumen de 50  $\mu$ l para el experimento de bloqueo y 100  $\mu$ l para el experimento de ADC monovalente en sus medios de cultivo recomendados suplementados con suero bovino fetal al 10 %. Para los experimentos de bloqueo de Acm desarmados, se agregaron 50  $\mu$ l de una solución de 300  $\mu$ g/ml de EGFR IgG (RAA22) o cMET IgG (B09) a los pocillos y se preincubaron durante una hora a 37 grados C en una incubadora humidificada. Se preparó una concentración 3X de cada dosis de anticuerpo a ensayar mediante dilución en serie 4X de la reserva de anticuerpos en medio de cultivo. Cincuenta microlitros de cualquiera

de los medios solos, ADC de IgG de control de isotipo (R347-AZ1508) o ADC de EGFR-cMET (RAA22/B09-AZ1508) se añadieron a las células por triplicado de manera que la concentración final de anticuerpos osciló entre 67 nM y 0.0009 nM. Para el experimento de ADC monovalente, 50  $\mu$ l de reservas 3X de ADC de control de isotipo (R347-AZ1508), ADC de EGFR monovalente (RAA22/R347-AZ1508), ADC anti-cMET monovalente (B09/R347-AZ1508), combinaciones equimolares de los ADC monovalentes, o ADC de EGFR-cMET (RAA22/B09-AZ1508) se añadieron por triplicado en una serie de diluciones 4X comenzando a 60 nM y finalizando a 0.009 nM. Las células tratadas se cultivaron durante 72 horas a 37 grados C en una incubadora humidificada. La actividad metabólica se determinó utilizando el ensayo de viabilidad luminiscente CellTiter-Glo de Promega según las instrucciones del fabricante. Los datos se representaron como porcentaje de actividad metabólica en relación con el control no tratado. Los valores de  $CI_{50}$  se determinaron utilizando un análisis de regresión logística no lineal entre la viabilidad máxima (células no tratadas) y la respuesta máxima (inhibición máxima) con el software GraphPad Prism.

## 7.2 Resultados y conclusiones – prueba de concepto *in vitro* para el direccionamiento dual (experimento de bloqueo de Acm y ADC monovalente)

Se realizó *in vitro* experimentos para examinar la contribución relativa de los brazos de anticuerpos individuales a la actividad citotóxica del ADC biespecífico, tal como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en el experimento representativo en la **FIG. 10**, el pretratamiento de células NCI H1975 con IgG anti-cMET RAA22 dio como resultado un desplazamiento de la  $CI_{50}$  del ADC de EGFR-cMET (RAA22/B09-AZ1508) de aproximadamente 60 pM a 3,480 pM, una diferencia de aproximadamente 60 veces. El tratamiento con IgG anti-cMET B09 dio como resultado un desplazamiento de la  $CI_{50}$  a 680 pM, una diferencia de más de 11 veces. De manera similar, cuando las células NCI H1975 se trataron con el ADC de EGFR monoespecífico monovalente (RAA22/R347-AZ1508), la  $CI_{50}$  fue de aproximadamente 20,500 pM en comparación con 316 pM para el ADC biespecífico de EGFR-cMET, una diferencia de aproximadamente 65 veces (**FIG. 11**). La  $CI_{50}$  del ADC anti-cMET monoespecífico monovalente (B09/R347-AZ1508) fue de 2,772 pM, una diferencia de aproximadamente 13 veces en comparación con el anticuerpo biespecífico.

En conjunto, estos datos sugieren que el direccionamiento eficiente del ADC de EGFR-cMET a las células tumorales que coexpresan ambas dianas está impulsado en gran medida por la interacción biespecífica del ADC. Además, estos resultados muestran que el brazo de unión de afinidad reducida por EGFR es insuficiente para promover la administración eficiente de ADC en ausencia de unión de cMET, como lo demuestra la reducción drástica de la potencia cuando el brazo de cMET está bloqueado por un anticuerpo desarmado y por la débil

citotoxicidad del ADC de control de EGFR monovalente, RAA22/R347-AZ1508. Tomados en conjunto, estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la afinidad reducida del brazo de unión a EGFR del ADC biespecífico (RAA22/B09-AZ1508) promoverá la administración de ADC a los tumores que coexpresan EGFR y cMET, al tiempo que muestra una citotoxicidad reducida hacia las células que expresan principalmente sólo una de las dianas. Este efecto es más destacado cuando solo se dispone de EGFR para la interacción, lo que tiene implicaciones para mitigar las toxicidades provocadas por EGFR en órganos normales, como la piel, que expresa niveles significativos de EGFR pero relativamente poca cMET.

#### 10 EJEMPLO 8 – farmacología in vivo de ADC en modelos de xenoinjerto derivado del paciente (PDX)

Los modelos de xenoinjerto derivado del paciente (PDX) de cáncer humano se han convertido en una alternativa bien establecida a los xenoinjertos tumorales basados en líneas de células tumorales. Los modelos PDX se establecen a partir del tejido tumoral primario de un paciente implantado directamente en ratones inmunodeficientes para producir tumores propagados in vivo en el ratón. Los tumores así derivados se propagan posteriormente en ratones adicionales, sin cultivar *in vitro*, para establecer un banco de tejido tumoral PDX de paso bajo que se puede utilizar para implantar ratones de estudio. Una característica clave de los modelos PDX es que mantienen en gran medida la heterogeneidad histológica y genómica y preservan el perfil de expresión génica del tumor del paciente original correspondiente. En comparación con modelos de xenoinjertos basados en líneas de células tumorales, que utilizan poblaciones clonales de células tumorales que se han adaptado al crecimiento *in vitro*, las características de los modelos PDX pretenden replicar con mayor precisión las características de los tumores humanos reales, mejorando así el valor predictivo de los modelos preclínicos en ratones. De hecho, numerosos estudios han demostrado que los perfiles de respuesta y resistencia de los modelos PDX a los tratamientos estándares de cuidado se correlacionan estrechamente con los datos clínicos en sujetos humanos con un perfil tumoral determinado.

A pesar de las mejoras que ofrecen los modelos PDX, existen limitaciones en los diseños de estudios farmacológicos *in vivo* estándares, incluso cuando se aplican a modelos PDX. Para cada modelo de tumor, un estudio típico prueba un tratamiento farmacológico en niveles de dosis múltiples, junto con uno o más compuestos de control positivo o negativo, con suficientes ratones por grupo de tratamiento para respaldar las estadísticas dentro del modelo. La cantidad relativamente grande de ratones utilizados para un diseño de estudio de este tipo y el mayor costo de los modelos PDX pueden limitar la cantidad de modelos de tumor que se

pueden probar prácticamente para un compuesto determinado. Un enfoque alternativo/complementario para el diseño de estudio tradicional es el ensayo PDX en ratones, un enfoque basado en la población con el estilo del diseño de ensayo clínico en humanos. En este enfoque, para cada compuesto, un solo ratón se trata normalmente con un nivel de dosis única establecido a partir de estudios previos de búsqueda de intervalo de dosis, con un grupo control de tratamiento opcional para cada modelo. Debido a la pequeña cantidad de ratones necesarios para cada modelo, se pueden probar muchos modelos PDX, cada uno de los cuales representa un tumor humano único. En lugar de depender de las estadísticas dentro del modelo, las respuestas se evalúan en toda la población de modelos tumorales probados. Este enfoque puede proporcionar una estimación más precisa de la tasa de respuesta por una amplia gama de expresión de diana, fenotipos moleculares, subtipos de tumores u otras características de interés clínicamente relevantes. Además, la gran cantidad de modelos únicos que se pueden probar en un ensayo PDX puede permitir estudios más significativos de genómica exploratoria, transcriptómica o perfiles de expresión para comenzar la búsqueda temprana de correlaciones de respuesta o resistencia. Para el estudio a modo de ejemplo descrito aquí, se empleó un enfoque de "todos los participantes", probando todos los modelos de NSCLC disponibles en START Discovery, independientemente del nivel de expresión de diana o el fenotipo molecular.

### 8.1 Métodos

Los ensayos de PDX en ratones se llevaron a cabo en South Texas Accelerated Research Therapeutics (START, San Antonio, TX). START está acreditado por AAALAC International (Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) y cumple con el estándar global de AstraZeneca sobre cuidado y bienestar animal. Todos los modelos fueron desarrollados en START. Los modelos de xenoinjerto derivado del paciente (START-PDX) se establecieron a partir de tejido o líquido tumoral humano viable y se han pasado en serie en animales un número limitado de veces para mantener la heterogeneidad del tumor. A ratones desnudos atímicos (CrI:NU(NCr)-Foxn1nu) / CB-17 Scid (CB17/lcr-Prkdcscid/lcrIcoCrI) se les implantó unilateralmente en el flanco fragmentos tumorales recogidos de animales hospedadores, cada uno implantado de un lote de pase específico. Se registraron los volúmenes tumorales antes del estudio comenzando aproximadamente una semana antes de su fecha de inicio estimada. Cuando los tumores alcanzaron el intervalo apropiado de iniciación del volumen tumoral (TVI) (125-250 mm<sup>3</sup>), los animales se aleatorizaron en grupos de tratamiento y control y se inició la dosificación intravenosa (IV) (día 0); los animales fueron seguidos individualmente durante todo el estudio. La dosificación inicial comenzó el día 0; los animales de todos los grupos recibieron dosis I.V.

en peso (0.01 ml por gramo; 10 ml/kg). Los animales tratados con el fármaco recibieron dosis cada 7 días para un total de 4 dosis. A partir del día 0, se midieron las dimensiones del tumor con un calibrador digital y se registraron los volúmenes tumorales estimados para cada animal tratado y control; el volumen tumoral se calculó mediante la fórmula:  $TV = anchura^2 \times longitud \times 0.52$ . Las observaciones del crecimiento tumoral continuaron durante una semana después de la dosis final. Cada animal se sacrificó al alcanzar el punto final del volumen tumoral (TV) (volumen tumoral  $\geq 1 \text{ cm}^3$ ) o el punto final del tiempo de estudio de 28 días, lo que ocurriera primero. El período de observación se extendió para algunos modelos PDX con tumores de crecimiento lento. La inhibición del crecimiento tumoral (%TGI) se definió como el porcentaje de crecimiento tumoral versus el día 0 entre los grupos de tratamiento (TX) y control (C), según la fórmula:  $\%TGI = 1 - (TX_{\text{final}} - TX_{\text{inicial}}) / (C_{\text{final}} - C_{\text{inicial}})$ . El porcentaje de regresión tumoral se definió como el porcentaje de reducción tumoral de los tumores en los animales tratados en relación con el volumen tumoral del día 0 (día de la dosis inicial), calculado en el punto final del estudio de acuerdo con la siguiente fórmula:  $\%Regresión = (TX_{\text{promedio final}} - TX_{\text{promedio inicial}}) / (TX_{\text{promedio inicial}}) \times 100$ .

## 8.2 Resultados y conclusiones

Como se muestra en la **FIG. 12**, tanto el ADC de EGFR-cMET de alta afinidad, QD6/B09-AZ1508, como la variante con afinidad reducida por EGFR, RAA22/B09-AZ1508, indujeron la inhibición del crecimiento tumoral o regresiones en numerosos modelos PDX probados. Sorprendentemente, el ADC de afinidad reducida mostró una tendencia general de mayor número y profundidad de las respuestas observadas, en comparación con el ADC de mayor afinidad. Esta tendencia de actividad se invirtió ligeramente para los modelos PDX que respondieron menos al ADC de afinidad reducida, que se correlacionó un poco con la expresión de cMET más baja. Estas observaciones plantean la posibilidad de que la actividad del ADC de EGFR-cMET de afinidad reducida esté parcialmente impulsada por los niveles de expresión de cMET. El brazo de unión a EGFR de ambos anticuerpos biespecíficos se derivó del mismo anticuerpo de reacción cruzada de EGFR de ratón (véase el **Ejemplo 1**). La afinidad de unión intrínseca del anticuerpo QD6/B09 hacia el EGFR de ratón era de aproximadamente 6 nM, mientras que la afinidad del anticuerpo biespecífico RAA22/B09 era de aproximadamente 575 nM. La mejora inesperada de la actividad de la afinidad de EGFR reducida podría atribuirse a un impacto reducido del sumidero de EGFR en tejidos normales, como la piel, lo que da como resultado una exposición circulante general más alta del ADC. Independientemente, estos datos demuestran que la reducción de la afinidad hacia EGFR del anticuerpo biespecífico de EGFR-cMET no comprometió la eficacia in vivo del ADC resultante, pero inesperadamente mejoró la actividad en comparación con el ADC de mayor afinidad.

### 8.3 Estudio PDX a diferentes dosis

Se llevó a cabo otro experimento para probar diferentes dosis de los ADC en modelos PDX. Este experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 8.1, excepto que los ratones individuales que alcanzaron un volumen tumoral de  $\geq 2 \text{ cm}^3$  se eliminaron del estudio y la medición final se incluyó en la media del grupo hasta que la media alcanzó el punto final de volumen o el estudio alcanzó el punto final de tiempo de 63 días. Para el estudio ejemplificado, el ADC de EGFR-cMET de alta afinidad, QD6/B09-AZ1508, se probó a niveles de dosis de 1 y 2 mg/kg y la variante con afinidad reducida por EGFR, RAA22/B09-AZ1508, se probó a 1, 2 y 3 mg/kg.

Tal como se demuestra en la **FIG. 13**, tanto el ADC de EGFR-cMET de alta afinidad, QD6/B09-AZ1508, como la variante con afinidad reducida por EGFR, RAA22/B09-AZ1508, indujeron actividad inhibidora del crecimiento tumoral en modelos PDX a las dosis probadas. De acuerdo con los resultados descritos en el Ejemplo 8.2 y mostrados en la **FIG. 12**, el ADC de afinidad reducida fue generalmente más eficaz que el ADC de alta afinidad. En los cuatro modelos probados, el ADC de afinidad reducida indujo regresiones a niveles de dosis de 2 o 3 mg/kg, lo que demuestra que el ADC de afinidad reducida es eficaz en dosis moderadas. Estos datos proporcionan evidencia adicional de que la reducción de la afinidad del anticuerpo biespecífico de EGFR-cMET hacia EGFR no redujo la eficacia *in vivo* del ADC resultante, sino que mejoró la eficacia *in vivo* en comparación con el ADC de mayor afinidad.

#### EJEMPLO 9 – eficacia del ADC en el modelo PDX pancreático ortotópico

Los modelos de tumor *in vivo* subcutáneos son la base para examinar la eficacia de los agentes anticancerígenos. Sin embargo, este sitio de implantación del tumor se acompaña de una serie de limitaciones que deben tenerse en cuenta al interpretar los resultados *in vivo*. Estas deficiencias incluyen la vascularización del tumor y la falta de estroma específico de tejido en el crecimiento y la respuesta del tumor. Para hacer frente a estos desafíos, se comparó la eficacia *in vivo* de los conjugados de anticuerpo y fármaco biespecíficos de EGFR-cMET de alta y baja afinidad en modelos subcutáneos y ortotópicos de un modelo PDX pancreático MEDI-PANC-08. Para rastrear ortotópicamente el crecimiento de este tumor, se desarrolló una variante de PDX que expresa luciferasa (MEDI-PANC-08<sup>LUC</sup>) cuyo crecimiento podría ser rastreado usando Imaging.

### 9.1 Métodos

Todos los experimentos se realizaron en una instalación acreditada por la AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care), de acuerdo con las pautas del IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) de MedImmune para el trato

humano y el cuidado de los animales de laboratorio. Los animales se monitorizaron diariamente para determinar la morbilidad y mortalidad.

#### Modelo PDX subcutáneo

El modelo PDX pancreático MEDI-PANC-08 utilizado en este estudio provino de la biblioteca PDX de Internal MedImmune. El tumor PDX se propagó inicialmente en ratones NSG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ) de semilla, para generar suficiente material tumoral para sembrar el estudio de eficacia. Una vez que los tumores alcanzaron 800-1200 mm<sup>3</sup> los ratones fueron sacrificados humanamente por asfixia por CO<sub>2</sub>. Los tumores se aislaron en condiciones estériles, se cortaron en ~2 mm<sup>3</sup> piezas y se implantaron por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones NSG individuales usando una aguja trócar de calibre 11. Al alcanzar un tamaño de ~150-250 mm<sup>3</sup>, los ratones se aleatorizaron (según el volumen del tumor) en grupos de tratamiento y se trataron con los ADC (Q1Wx4). Se examinaron dos ADC biospecíficos de EGFR-cMET a 1, 2 y 3 mg/kg, QD6/B09 (alta afinidad) y RAA2/B09 (baja afinidad). También se probó un ADC control de isotipo (R347-AZ1508) a 3 mg/kg. Todos los conjugados de anticuerpo y fármaco se diluyeron en tampón (histidina 25 mM, sacarosa al 7 %, PS80 al 0.02 %, pH 6.0), inmediatamente antes de su uso y se administraron i.v. a través de la vena de la cola. Las mediciones del peso corporal y del tumor se recogieron dos veces por semana y el volumen del tumor se calculó usando la ecuación  $(L \times W^2)/2$ , donde L y W se refieren a las dimensiones de longitud y anchura, respectivamente.

#### Modelo PDX ortotópico

El modelo PDX que expresa luciferasa (MEDI-PANC-08<sup>Luc</sup>) se hizo crecer por vía subcutánea en ratones de semilla NSG y en un volumen de 800-1200 mm<sup>3</sup> los tumores se extrajeron y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 2 mm<sup>3</sup>. Los fragmentos tumorales se suturaron posteriormente al páncreas de ratones NSG (día cero). La señal de luciferasa se determinó semanalmente usando el sistema de obtención de imágenes IVIS Spectrum *in vivo*. Brevemente, 10 minutos antes de la obtención de imágenes, se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) 200 µl de luciferina disuelta en DPBS (15 mg/ml). Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 3 %, se colocaron sobre su lado derecho y se midió la luminiscencia. Catorce días después del implante del tumor, cuando la señal luminiscente era claramente detectable, los ratones se aleatorizaron en sus respectivos grupos en función de la luminiscencia. Los ratones se trataron con control de isotipo (R347-AZ1508, 3 mg/kg – Q1Wx4), gemcitabina (75 mg/kg, Q2Dx5) y ADC RAA2/B09 (2 y 3 mg/kg – Q1Wx4). La luminiscencia se midió semanalmente. Los criterios de valoración del estudio incluyeron pérdida de peso corporal, deterioro del estado corporal y letargo. Los datos se analizaron

usando el software Living Image (Perkin Elmer) y se representaron como radiancia promedio [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] frente al tiempo.

## 9.2 Resultados y discusión

Para ayudar en la selección de la combinación de afinidad de EGFR adecuada para el ADC biespecífico de EGFR-CMET, se compararon los ADC biespecíficos de EGFR-cMET de alta y baja afinidad en un estudio de eficacia *in vivo* utilizando el modelo PDX pancreático MEDI-PANC-08. Como se muestra en los paneles A y B de la **FIG. 14**, se observó una diferencia dispar entre las 2 moléculas. El ADC QD6/B09 de alta afinidad no mostró eficacia en ninguno de los 3 niveles de dosis probados. Por el contrario, el ADC RAA2/B09 de baja afinidad produjo una regresión tumoral completa en el día 65, seguida de un nuevo crecimiento tumoral con el nivel de dosis de 3 mg/kg y la inhibición del crecimiento tumoral con 2 mg/kg.

Si bien los modelos de tumores subcutáneos se han convertido en el caballo de batalla para los estudios de eficacia *in vivo*, una deficiencia importante es que los tumores no crecen en el sitio de origen y, por lo tanto, es posible que la respuesta al fármaco no refleje realmente cómo responderán los pacientes. Para abordar esta preocupación, se desarrolló un modelo ortotópico de cáncer pancreático usando el tumor MEDI-PANC-08 que había sido modificado transgénicamente para expresar luciferasa de manera estable. Después de la implantación quirúrgica en el páncreas, se permitió que los tumores se establecieran y posteriormente se aleatorizaron en función de la señal luminiscente. A continuación, los ratones se trataron con ADC de EGFR-cMET RAA2/B09 de baja afinidad, control de isotipo o gemcitabina (un fármaco de quimioterapia). Después del tratamiento, la luminiscencia se midió semanalmente. Como se muestra en el Panel C de la **FIG. 14** la luminiscencia en los grupos de control de isotipo y no tratados aumenta con el tiempo con los animales retirados del estudio debido al mal estado corporal y los grandes tumores abdominales palpables. La gemcitabina mostró una reducción inicial en la señal luminiscente que alcanzó una cifra mínima alrededor del día 21, después de lo cual la señal aumentó con el tiempo y el grupo se retiró del estudio el día 49. En el modelo ortotópico, los niveles de dosis de 2 y 3 mg/kg de ADC RAA2/B09 causaron una reducción en la señal luminiscente que se acercó a los niveles de fondo en el día 60. En comparación con el estudio subcutáneo, el nivel de dosis de 2 mg/kg demostró una mejor actividad produciendo regresiones tumorales. La necropsia de los animales al final del estudio que mostró tumores con señales luminiscentes cercanas al fondo ya no mostró un tumor visible, lo que respalda la correlación entre la señal luminiscente y el volumen del tumor.

En conclusión, el ADC de EGFR-cMET RAA2/B09 de baja afinidad demostró una eficacia mejorada en comparación con el ADC QD6/B09 de alta afinidad en un modelo de PDX

pancreático subcutáneo, con regresiones tumorales observadas a 3 mg/kg. Esta eficacia también se observó en un modelo ortotópico usando el mismo tumor PDX (MEDI-PANC-08) modificado por ingeniería para expresar luciferasa de manera estable. Utilizando la luminiscencia como un sustituto del volumen tumoral, el ADC RAA2/B09 mostró una eficacia mejorada sobre el modelo subcutáneo que produjo regresiones tumorales tanto con 2 como con 3 mg/kg.

#### EJEMPLO 10 – Seguridad y farmacocinética

Se llevaron a cabo análisis farmacocinéticos (PK) para comparar los parámetros PK plasmáticos de los ADC de EGFR-cMET de baja y alta afinidad, incluida la exposición máxima y total, la eliminación y la vida media en ratones y macacos cynomolgus. Un objetivo clave era determinar si la reducción de la afinidad por EGFR afectaría a la exposición circulante del ADC biespecífico de EGFR-cMET. Se recogieron muestras PK en ratones y macacos cynomolgus tanto para QD6/B09-57-AZ1508 como para RAA/B09-57-AZ1508 por diversos niveles de dosis. Se realizó un análisis no compartimental para estimar los parámetros PK para QD6/B09-57-AZ1508 y RAA22/B09-57-AZ1508 en función de las concentraciones totales de ADC entre especies y niveles de dosis.

En general, RAA22/B09-57-AZ1508 muestra una mayor exposición y una  $t_{1/2}$  prolongada en comparación con QD6/B09-57-AZ1508 tanto en ratones como en macacos cynomolgus, lo que sugiere una mejor PK en el RAA22/B09-57-AZ1508 de menor afinidad.

##### *10.1 Bioanálisis del ensayo PK preclínico*

La concentración de los compuestos diana (QD6/B09-57-AZ1508 y RAA22/B09-57-AZ1508) y la concentración total de anticuerpos se midieron con un ensayo de inmunocaptura LC-MS/MS. Brevemente, se conjugó un anticuerpo antihumano policlonal con perlas magnéticas. Luego se diluyeron 25  $\mu$ l de muestra de plasma en PBS y se incubaron junto con las perlas magnéticas. Después de la captura, las perlas magnéticas se lavaron varias veces antes de digerirlas con tripsina en presencia de patrones internos. La digestión se extinguió con la adición de ácido. A continuación, el contenido líquido se transfirió a la placa de inyección.

El péptido tríptico característico en la región Fc del anticuerpo humano y la ojiva escindida se separaron mediante cromatografía de fase inversa (RPLC), seguida de detección usando supervisión de reacciones múltiples (MRM). Un péptido característico en la región Fc se usó para calcular el Ac total, mientras que la ojiva liberada por digestión se usó para calcular los ADC. El estándar interno utilizado en este experimento es un péptido o una proteína marcados isotópicamente (SiluMAb, Sigma-Aldrich) o una ojiva marcada

isotópicamente. La relación del área del pico del analito frente a los estándares internos se utilizó para calcular frente a la curva estándar.

Las curvas estándares y los QC se preparan agregando los compuestos diana a diferentes niveles en la misma matriz que las muestras. El intervalo de cuantificación cubre 100 ng/ml-15,000 ng/ml, con el QC de dilución cubriendo hasta 525,000 ng/ml. La curva estándar se ajustó con el modelo más simple posible. La exactitud y precisión del ensayo está dentro del 20 % para todos los niveles excepto el límite de cuantificación inferior (LLOQ), que está en el 25 %.

#### 10.2 PK de QD6/B09-57-AZ1508 en ratones

Los estudios en ratones incluidos en el análisis NCA se resumen en la **Tabla 4**.

**Tabla 4** Lista de estudios en ratones en RAA22/B09-57-AZ1508 y QD6/B09-57-AZ1508

| Estudio                                                  | Título del estudio                                                                   | Diseño del estudio                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 03-EGFR cMET-ADC-PK -15-003-A                            | Estudio farmacocinético de cMET-EGFR-AZ1508 en ratones desnudos (QD6/B09-57-AZ1508)  | Dosis IV única con 1, 3, 5 y 10 mg/kg; extracciones de plasma a las 0.5, 4, 24, 48, 72, 144 y 240 h; análisis LC-MS/MS de ADC y Ac total                                  |
| Estudio PK en ratones RAA22/B09-AZ1508 - octubre de 2016 | Estudio farmacocinético de DuetMAb de cMET-EGFR RAA22/B09-AZ1508 en ratones desnudos | Dosis IV única de 0.5, 1, 3, 5 y 10 mg/kg; extracciones de plasma a las 0.5 h, 4 h, 1 día, 2 días, 3 días, 6 días, 10 días y 14 días; análisis LC-MS/MS de ADC y Ac total |

Los perfiles PK medios de concentración-tiempo en ratones para RAA22/B09-57-AZ1508 y QD6/B09-57-AZ1508 se presentan en la **FIG. 15**.

Tanto RAA22/B09-57-AZ1508 como QD6/B09-57-AZ1508 exhibieron PK lineal en ratones a los niveles de dosis probados, con exposición proporcional a la dosis ( $C_{\text{máx}}$  y AUC), CL y  $t_{1/2}$  comparables observados con de 0.5 mg/kg a 10 mg/kg para RAA22/B09-57-AZ1508 y con de 1 mg/kg a 10 mg/kg para QD6/B09-57-AZ1508, respectivamente.

La comparación PK entre RAA22/B09-57-AZ1508 y QD6/B09-57-AZ1508 se evalúa a niveles de dosis de 1, 3, 5, 10 mg/kg que se probaron para ambos compuestos y los parámetros PK medios basados en NCA se resumen en la **Tabla 5**. Los resultados demostraron una CL más lenta, una mayor exposición y una  $t_{1/2}$  prolongada en RAA22/B09-57-AZ1508, con AUC media de RAA22/B09-57-AZ1508 que mostró un aumento de 2 a 2.91 veces en comparación con QD6/B09-57-AZ1508; la  $t_{1/2}$  media varió de 4.24 a 6.38 días para

RAA22/B09-57-AZ1508 y de 2.57 a 3.33 días para QD6/B09-57-AZ1508, representó un aumento de 1.27 a 2.32 veces de  $t_{1/2}$  para RAA22/B09-57-AZ1508.

**Tabla 5 Parámetros PK medios de NCA por niveles de dosis entre RAA22/B09-57-AZ1508 y QD6/B09-57-AZ1508 en ratones**

|    |                                |                            |                          |                            |                          |                            |                          |                            |                          |
|----|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 5  | <b>Dosis (mg/kg)</b>           | <b>1 mg/kg</b>             |                          | <b>3 mg/kg</b>             |                          | <b>5 mg/kg</b>             |                          | <b>10 mg/kg</b>            |                          |
| 10 | <b>Molécula</b>                | <b>RAA22/B09-57-AZ1508</b> | <b>QD6/B09-57-AZ1508</b> | <b>RAA22/B09-57-AZ1508</b> | <b>QD6/B09-57-AZ1508</b> | <b>RAA22/B09-57-AZ1508</b> | <b>QD6/B09-57-AZ1508</b> | <b>RAA22/B09-57-AZ1508</b> | <b>QD6/B09-57-AZ1508</b> |
| 15 | <b>C<sub>máx</sub> (mg/ml)</b> | 12.8                       | 11.3                     | 51.1                       | 31.0                     | 90.7                       | 44.8                     | 198                        | 134                      |
| 20 | <b>AUC (mg*día/ml)</b>         | 41.0                       | 20.5                     | 136                        | 57.5                     | 230                        | 87.9                     | 494                        | 170                      |
|    | <b>t<sub>1/2</sub> (día)</b>   | 5.97                       | 2.57                     | 4.24                       | 3.33                     | 6.38                       | 3.28                     | 5.31                       | 2.95                     |
|    | <b>CL (ml/kg/día)</b>          | 20.8                       | 45.7                     | 20.0                       | 46.9                     | 18.5                       | 50.8                     | 17.3                       | 53.8                     |

### 10.3 PK de QD6/B09-57-AZ1508 en macacos cynomolgus

Los estudios en macacos cynomolgus incluidos en el análisis NCA se resumen en la

**Tabla 6.**

**Tabla 6 Lista de estudios en macacos cynomolgus en RAA22/B09-57-AZ1508 y QD6/B09-57-AZ1508**

|    |                |                                                                                                                                                     |                                |
|----|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 25 | <b>Estudio</b> | <b>Título del estudio</b>                                                                                                                           | <b>Diseño del estudio</b>      |
| 30 | 20102256       | RAA22/B09-Maia-AZ1508: Un estudio de toxicidad de dosis repetidas intravenosas para evaluar la seguridad y la farmacocinética en macacos cynomolgus | Inyección IV en bolo Q3 Wk x 2 |
| 35 | 20067678       | Un estudio de búsqueda de intervalo de dosis de 8 semanas de EGFR cMET por inyección intravenosa en bolo en                                         | Inyección IV en bolo Q3 Wk x 3 |

|   |                                                                                                                            |                                  |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
|   | macacos cynomolgus                                                                                                         |                                  |
| 5 | Una dosis única ascendente de EGFRcMet-ADC (EGFRcMet-1508) de 20067312 8 semanas por vía intravenosa en macacos cynomolgus | Dosificación IV ascendente única |

Los perfiles PK medios de concentración-tiempo en macacos cynomolgus para RAA22/B09-57-AZ1508 y QD6/B09-57-AZ1508 se presentan en la **FIG. 16**.

10 RAA22/B09-57-AZ1508 exhibió PK lineal en macacos cynomolgus a dosis de 2 mg/kg a 5 mg/kg, con exposición proporcional a la dosis ( $C_{\text{máx}}$  y AUC), CL y  $t_{1/2}$  comparables observados.

QD6/B09-57-AZ1508 exhibió PK no lineal en macacos cynomolgus a 0.67 mg/kg a 3 mg/kg, con una exposición más que proporcional a la dosis ( $C_{\text{máx}}$  y AUC) mostrada, y CL más rápido y  $t_{1/2}$  más corto observados a niveles de dosis más bajos.

15 La comparación PK entre RAA22/B09-57-AZ1508 y QD6/B09-57-AZ1508 en macacos cynomolgus se evalúa a niveles de dosis de 2 y 3 mg/kg que se probaron para ambos compuestos y los parámetros PK medios basados en NCA se resumen en la **Tabla 7**. Los resultados demostraron una CL más lenta, una mayor exposición y una  $t_{1/2}$  prolongada en RAA22/B09-57-AZ1508, con AUC media de RAA22/B09-57-AZ1508 que mostró un aumento  
20 de 1.90 a 2.43 veces en comparación con QD6/B09-57-AZ1508; la  $t_{1/2}$  media era de 4.30 a 5.90 días para RAA22/B09-57-AZ1508 y de 0.969 a 1.07 días para QD6/B09-57-AZ1508, lo que representó un aumento de 4.44 a 5.51 veces de  $t_{1/2}$  para RAA22/B09-57-AZ1508.

**Tabla 7 Parámetros PK medios de NCA por niveles de dosis entre RAA22/B09-57-AZ1508 y QD6/B09-57-AZ1508 en macacos**

|    |                                            |                            |                           |                            |                          |
|----|--------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 25 | <b>Dosis (mg/kg)</b>                       | <b>2 mg/kg</b>             |                           | <b>3 mg/kg</b>             |                          |
|    | <b>Molécula</b>                            | <b>RAA22/B09-57-AZ1508</b> | <b>QD6/B09-57-AZ1508*</b> | <b>RAA22/B09-57-AZ1508</b> | <b>QD6/B09-57-AZ1508</b> |
|    | <b><math>C_{\text{máx}}</math> (mg/ml)</b> | 59.1                       | 47.5                      | 86.6                       | 73.3                     |
| 30 | <b>AUC (mg*día/ml)</b>                     | 116                        | 47.6                      | 179                        | 94.4                     |
|    | <b><math>t_{1/2}</math> (día)</b>          | 5.90                       | 1.07                      | 4.30                       | 0.969                    |
|    | <b>CL (ml/kg/día)</b>                      | 16.7                       | 42.2                      | 16.5                       | 31.6                     |

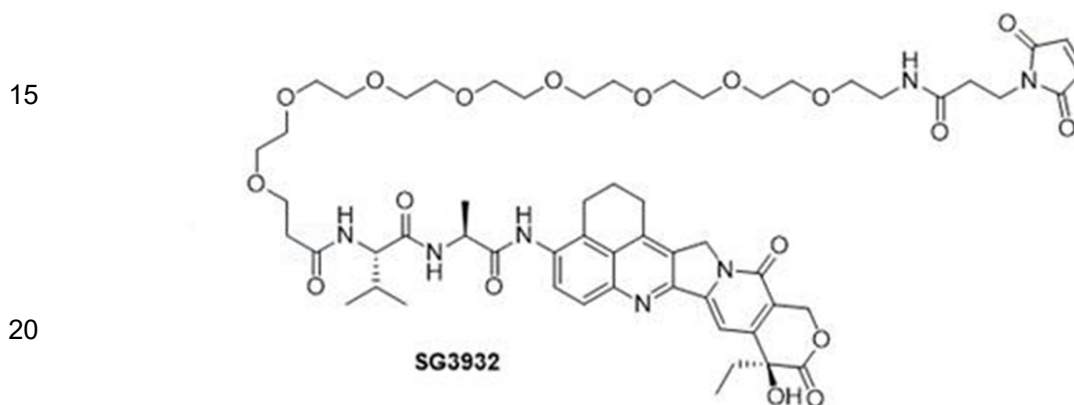
35 Tomados en conjunto, estos datos demuestran que RAA22/B09-57-AZ1508 de baja afinidad muestra una mayor exposición y un aumento de la vida media circulante en

comparación con el QD6/B09-57-AZ1508 de alta afinidad tanto en ratones como en macacos cynomolgus. Estos datos son consistentes con la hipótesis de que la reducción de la afinidad por el EGFR reduce la unión al EGFR presente en el tejido normal, reduciendo de ese modo el impacto del sumidero del tejido normal y mejorando los parámetros PK de plasma.

#### 5 EJEMPLO 11 – ADC con inhibidor de la topoisomerasa I como carga útil

Se diseñó un experimento para probar la eficacia y la seguridad de la molécula biespecífica RAA22/B09-57 conjugada con una carga útil diferente – un inhibidor de la topoisomerasa I en lugar de la tubulicina utilizada en los ejemplos anteriores.

10 El anticuerpo biespecífico DuetMab RAA22/B09 (con la inserción de cisteína "Maia" después de la serina 239) producido según el Ejemplo 1 se conjugó con el inhibidor de la topoisomerasa SG3932 mediante conjugación "clásica" con cisteínas nativas en el anticuerpo biespecífico.



La eficacia del ADC de inhibidor de la topoisomerasa I y EGFR/cMET se investigó usando un ensayo PDX. El ensayo PDX se llevó a cabo esencialmente como se describió anteriormente para el Ejemplo 8 usando una variedad de diferentes modelos PDX obtenidos de tumores pancreático, de colon, de NSCLC y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SQHN). A los animales se les inyectó una dosis única de ADC de EGFR-cMET Maia Topo a 10 mg/kg. Los resultados del ensayo PDX que utiliza el ADC de EGFR-cMET Maia Topo se informan en la **FIG. 17**.

30 Tal como se muestra en la **FIG. 17**, el ADC de EGFR-cMET Maia Topo indujo la inhibición o regresión del crecimiento tumoral en numerosos modelos PDX probados. Por lo tanto, estos resultados demuestran que RAA22/B09-57ADC que contiene el inhibidor de la topoisomerasa I fue eficaz en los modelos PDX que representan múltiples tipos de tumores.

#### EJEMPLO 12 – Mutaciones para mejorar PK del ADC

35 El ADC con el inhibidor de la topoisomerasa I producido y probado en el Ejemplo 11 usó el anticuerpo biespecífico RAA22/B09 que contiene la inserción de cisteína "Maia"

después de la serina 239. Sin embargo, dado que SG3932 se conjuga con cisteínas nativas, la inserción de cisteína Maia no es necesaria. Por lo tanto, se buscó modificar el ADC RAA22/B09 Maia Topo producido en el Ejemplo 11 para eliminar esta inserción de cisteína.

También se reconoció que puede ser posible mitigar las toxicidades inmunitarias y mejorar la farmacocinética si se reducían o eliminaban las funciones efectoras del esqueleto Fc. Por lo tanto, se introdujo también el "triple mutante (TM)" de L234F/L235E/P331S (numeración de EU) que anteriormente se demostró que reduce las funciones efectoras de Fc en las moléculas de anticuerpo (Organesyan, 2008; Hay, 2016).

La molécula "EGFR-cMET TM" recién generada, que comprende regiones variables de RAA22 y B09, con la mutación 239i eliminada y el TM introducido, tiene las secuencias de aminoácidos expuestas en la siguiente tabla:

|                       | EGFR-cMET TM |
|-----------------------|--------------|
| Cadena pesada de EGFR | 59           |
| Cadena pesada c-Met   | 60           |
| Cadena ligera de EGFR | 61           |
| Cadena ligera c-Met   | 62           |

Para la conjugación con SG3932, se añadió una solución 50 mM de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en solución salina tamponada con fosfato pH 7.4 (PBS) (12.5 equivalentes molares/anticuerpo) a una solución de anticuerpo biespecífico de EGFR-cMET TM en tampón de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y una concentración final de anticuerpo de ~ 3 mg/ml. La mezcla de reducción se dejó incubar a 37 °C durante 2 h en un agitador orbital con agitación suave (60 rpm). La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente durante 45 min. Luego se agregó SG3932 como una solución de DMSO (12.5 equivalentes molares/anticuerpo) para una concentración de DMSO final al 10 % (v/v). La solución se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se inactivo mediante la adición de *N*-acetilcisteína (5 micromoles/SG3932) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. La mezcla de reacción se filtró utilizando un filtro estéril de 0.2 µm y luego se almacenó a 2-8 °C durante la noche. El exceso de fármaco libre se eliminó a través de la unidad de filtración de flujo tangencial (TFF) usando mPES, filtro de fibra MidiKros® de 30 kDa con 375 cm<sup>2</sup> de área superficial, en tampón que contenía 30 mM de histidina, 30 mM de arginina, pH 6.8. El grado de eliminación del fármaco libre se supervisó mediante UHPLC-RP usando conjugado puro. Después de la eliminación completa del fármaco libre, se intercambió el tampón de ADC. El

ADC se filtró utilizando un filtro de 0.22 µm en atmósfera estéril y luego se añadió polisorbato-80 hasta una concentración final del 0.02 % (p/v).

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Thermo Scientific MAbPac de 50 mm x 2.1 mm que eluye con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida de ADC a 214 nm y 330 nm (específico de SG3932) reveló una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 6.0 moléculas de SG3932 por anticuerpo.

La eficacia del ADC de EGFR-cMET TM se investigó mediante un ensayo PDX. El ensayo de PDX se llevó a cabo esencialmente como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 8 utilizando una gama de diferentes modelos PDX obtenidos de tumores pancreático, colon, NSCLC y SQHN. A los animales se les inyectó una dosis única del ADC de EGFR-cMET TM a 5 mg/kg. Los resultados del ensayo PDX que utiliza el ADC de EGFR-cMET TM se informan en la **FIG. 18**. Los resultados de este experimento demuestran que el ADC de EGFR-cMET TM fue capaz de inducir la inhibición o regresión del crecimiento tumoral en numerosos modelos PDX probados.

La eficacia del ADC de EGFR-cMET TM ("ADC de TM") se comparó con el ADC de EGFR-cMET Maia Topo ("ADC de Maia") producido en el Ejemplo 11 en los modelos PDX SQHN-02 y PANC-08. Los animales recibieron dosis de 2.5 mg/kg, 5 mg/kg o 10 mg/kg de cada ADC y se supervisó el crecimiento del tumor. También se incluyó en este experimento un control no tratado ("no tratado") y un animal dosificado con EGFR-cMET TM no conjugado (Acm TM). Los resultados se muestran en la **FIG. 19**.

Los resultados demuestran que tanto el ADC de EGFR-cMET TM como el ADC de EGFR-cMET Maia Topo son igualmente eficaces ("equipotentes") para reducir el crecimiento tumoral / inducir la regresión tumoral en el intervalo de dosis probadas. Esto sugiere que la eliminación de la mutación S239i y la anulación de las funciones efectoras de Fc utilizando el triple mutante no afecta negativamente a la eficacia en estos modelos de tumor.

También se demostró que el ADC de EGFR-cMET TM es eficaz para reducir el crecimiento tumoral en tumores de NSCLC que expresan cualquiera de EGFR sin mutaciones o mutante. Los resultados demuestran que el ADC de EGFR-cMET TM es activo tanto en los modelos PDX de EGFR sin mutaciones como en mutante que se muestran en la **FIG. 20**. Esto es ventajoso, ya que indica que los ADC podrán proporcionar un beneficio en múltiples entornos terapéuticos y en una gama de diferentes genotipos de EGFR.

Finalmente, se llevaron a cabo estudios farmacocinéticos (PK) en ratones NOD-SCID para comparar el ADC de EGFR-cMET TM ("ADC de TM") y el ADC de EGFR-cMET Maia

Topo ("ADC de Maia") producidos en el Ejemplo 11. El experimento se llevó a cabo en gran parte como se describe en el Ejemplo 10.

Los resultados representativos de estos estudios PK se proporcionan en la **FIG. 21**. Como se informa en esta figura, el ADC de EGFR-cMET TM exhibió una mayor vida media ( $t_{1/2}$  = 5.0 días) y una reducción del aclaramiento del fármaco ( $CL$  = 14.8 ml/día/kg) en comparación con el ADC de EGFR-cMET Maia Topo ( $t_{1/2}$  = 3.0 días;  $CL$  = 39.7 ml/día/kg). Por lo tanto, los resultados indican que el ADC de EGFR-cMET TM descrito aquí muestra una PK mejorada en comparación con el ADC de EGFR-cMET Maia Topo producido en el Ejemplo 10. También se observó una mejora similar en la PK al comparar el anticuerpo anti EGFR-cMET TM no conjugado ("Acm TM") con el EGFR-cMET Maia no conjugado ("ADC de Maia").

**EJEMPLO 13 –Degradación de los receptores EGFR y cMet después del tratamiento con el ADC de EGFR-CMET TOP1i TM**

La degradación de los receptores mediada por anticuerpos se llevó a cabo mediante un análisis de inmunotransferencia de Western de la siguiente manera:

Se sembraron células del grupo HCC827 GR en placas de cultivo de 12 pocillos (Corning/Costar) con una densidad de  $6 \times 10^5$  células/pocillo en 2 ml de medio RPMI (Gibco) que contenía un 10 % de suero bovino fetal desactivado con calor (HI FBS, Gibco). Se permitió que las células se adherieran y crecieran durante la noche a 37 °C en una incubadora con un 5 % de CO<sub>2</sub>. A la mañana del día siguiente, el medio de crecimiento se retiró cuidadosamente por aspiración y las células se trataron con 1 ml de medio de crecimiento fresco que contenía los Acm de prueba identificados en la Tabla 9, cada uno de ellos con una concentración final de 10 microgramos por ml. Las células se incubaron a 37 °C en una cámara de cultivo humidificada con un 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. A continuación, el medio se retiró cuidadosamente por aspiración y las células se lavaron una vez con 2 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) sin calcio ni magnesio. Las células se sometieron a lisis mediante la adición de 150 microlitros del reactivo de extracción de proteínas de mamíferos M-per (Thermo Scientific) que contenía el cóctel de inhibidores de proteasas Complete (Roche) y el cóctel de inhibidores de fosfatasas PhosStop (Roche). Para propiciar una lisis más completa, las placas se transfirieron a -80 °C y se sometieron a un ciclo de congelación-descongelación. Los lisados resultantes se transfirieron a tubos de microcentrífuga y se retiraron los residuos celulares mediante una centrifugación durante 10 minutos a velocidad máxima (14 000 RPM) en una microcentrífuga a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a tubos de microcentrífuga limpios y se almacenó a -80 °C antes de su análisis. La concentración de proteína se midió utilizando un kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific).

Para el análisis de inmunotransferencia de Western (Invitrogen), se utilizaron 4X LDS (Invitrogen) y 10X Agente reductor de muestras (Invitrogen) para preparar las muestras hasta alcanzar una concentración de proteína final de 10 microgramos de proteína (1X LDS y 1X agente reductor de muestras) en un volumen de 16 microlitros. Las muestras se calentaron durante 10 minutos a 95 °C, a continuación se enfriaron hasta temperatura ambiente y se centrifugaron brevemente. Se cargaron 10 microgramos de proteína por muestra en geles de Bis-Tris al 4-12 % (NuPage, Invitrogen), en tampón de MOPS y se sometieron a electroforesis durante una hora a un voltaje constante de 200 V. Las proteínas separadas se transfirieron a la membrana [difluoruro de polivinilideno (PDVF)] utilizando un aparato de transferencia iBlot (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las inmunotransferencias se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS) T20 libre de proteínas Pierce (Thermo Scientific) durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con un anticuerpo específico primario durante la noche a 4 °C [(diluciones 1:4500 de cMET total; dilución de 1:2500 de EGFR total y 1:15 000 de beta-actina] (Cell Signaling Technologies) en tampón de bloqueo. Los anticuerpos unidos específicamente se detectaron con anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson Immunoresearch) utilizando el reactivo SuperSignal West Dura ECL (Pierce/Thermo Scientific). Las imágenes se capturaron con GE Image Quant LAS 4000.

Tabla 9. Acm de prueba utilizados en el análisis de degradación de receptores

| Reactivo                          | Descripción                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| hIgG R347-TM                      | IgG de control                                                                                                                                                                                                               |
| Acm contra EGFR RAA22/R347        | Acm con brazo simulado de EGFR que comprende dominios VH y VL de unión a EGFR de SEQ ID Nos: 18 y 20, respectivamente, y secuencias de dominios VH y VL de R347, en lugar de un brazo de unión a cMet, y sin carga de TOP1i  |
| Acm contra cMET B09/R347          | Acm con brazo simulado de cMet, que comprende dominios VH y VL de unión a cMet de SEQ ID Nos: 38 y 40, respectivamente, y secuencias de dominios VH y VL de R347, en lugar de un brazo de unión a EGFR, y sin carga de TOP1i |
| Acm biespecífico contra EGFR/cMET | que comprende los dominios VH y VL de unión a EGFR de SEQ ID Nos: 18 y 20, respectivamente, y los dominios VH y VL de unión a cMet de SEQ                                                                                    |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | ID Nos: 38 and 40, respectivamente, pero sin carga TOP1i                                                                                                                                                                                                                                     |
| 5  | ADC contra EGFR-cMet TOP1i TM<br>que comprende una 1. <sup>a</sup> cadena pesada de SEQ ID NO: 59, una 2. <sup>a</sup> cadena pesada de SEQ ID NO: 60, una 1. <sup>a</sup> cadena ligera de SEQ ID NO: 61 y una 2. <sup>a</sup> cadena ligera de SEQ ID NO: 62, más la carga de TOP1i SG3932 |
| 10 | Amivantamab<br>tal como se describe en, p. ej., la reivindicación 1 del documento US9593164B2                                                                                                                                                                                                |

Los resultados, que se muestran en la FIG. 22, indican que los Acm con brazo simulado de R347 o su combinación no inducen una modulación a la baja significativa de los receptores, mientras que el anticuerpo biespecífico sí. Esto concuerda con la hipótesis de que la internalización de los Acm es óptima cuando participan ambas dianas EGFR y cMet. Además, parece ser que el Acm contra EGFR-cMet provoca cierta degradación de cMet y una cantidad comparable de degradación de EGFR en comparación con el ADC contra EGFR-cMet TOP1i TM. Es más, parece ser que el ADC contra EGFR-cMet TOP1i TM induce más degradación de cMet que amivantamab (un anticuerpo biespecífico contra EGFR-cMet aprobado recientemente que se ha descrito que induce degradación de los receptores).

### **REFERENCIAS**

Se han citado anteriormente varias publicaciones con el fin de describir y divulgar de manera más completa la divulgación y el estado de la técnica al que pertenece la divulgación. A continuación, se proporcionan las citas completas de estas referencias. La totalidad de cada una de estas referencias se incorpora en el presente documento.

|    |                |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 25 | Altschul, 1990 | Altschul, S.F. et al., <i>Basic local alignment search tool.</i> , J Mol Biol. 1990, 215(3):403-10.                                                                                                                                                                                 |
|    | Altschul, 1997 | Altschul, S.F. et al. <i>Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.</i> Nucl. Acids Res., 1997, 25 3389-3402                                                                                                                                 |
| 30 | Andreev, 2017  | Andreev, J., et al., <i>Bispecific Antibodies and Antibody-Drug Conjugates (ADCs) Bridging HER2 and Prolactin Receptor Improve Efficacy of HER2 ADCs.</i> Molecular cancer therapeutics, 2017.                                                                                      |
| 35 | Angevin, 2017  | Angevin, E., et al., <i>Phase I study of ABBV-399, a c-Met antibody-drug conjugate (ADC), as monotherapy and in combination with erlotinib in patients (pts) with non-small cell lung cancer (NSCLC).</i> Journal of Clinical Oncology, 2017. <b>35</b> (15_supl.): pág. 2509-2509. |

|    |                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Ariyawutyakorn, 2016      | Ariyawutyakorn, W., S. Saichaemchan, y M. Varella-Garcia, <i>Understanding and Targeting MET Signaling in Solid Tumors - Are We There Yet?</i> Journal of Cancer, 2016. <b>7</b> (6): pág. 633-649.                                                                                         |
| 5  | Arteaga, 2014             | Arteaga, C.L. y J.A. Engelman, <i>ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics</i> . Cancer Cell, 2014. <b>25</b> (3): pág. 282-303.                                                                                                     |
| 10 | Bachleitner-Hofmann, 2008 | Bachleitner-Hofmann, T., et al., <i>HER kinase activation confers resistance to MET tyrosine kinase inhibition in MET oncogene-addicted gastric cancer cells</i> . Mol Cancer Ther, 2008. <b>7</b> : pág. 3499-3508.                                                                        |
|    | Bagshawe, 1991            | Bagshawe et al. <i>Antibody-enzyme conjugates can generate cytotoxic drugs from inactive precursors at tumor sites</i> . Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals, 1991, 4: 915-922                                                                                              |
| 15 | Bardelli, 2013            | Bardelli, A., et al., <i>Amplification of the MET Receptor Drives Resistance to Anti-EGFR Therapies in Colorectal Cancer</i> . Cancer Discovery, 2013. <b>3</b> (6): pág. 658-673.                                                                                                          |
| 20 | Bardia, 2017              | Bardia et al. <i>Efficacy and Safety of Anti-Trop-2 Antibody Drug Conjugate Sacituzumab Govitecan (IMMU-132) in Heavily Pretreated Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer</i> . J Clin Oncol. 2017, 35(19):2141-2148                                                        |
| 25 | Bean, 2007                | Bean, J., et al., <i>MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib</i> . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. <b>104</b> (52): pág. 20932-20937. |
|    | Beck, 2017                | Beck, A., et al. <i>Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates.</i> , Nature Reviews Drug Discovery, 2017, 16, pág. 315-337                                                                                                                              |
| 30 | Belalcazar, 2010          | Belalcazar, A., et al., <i>Targeting the Met pathway in lung cancer</i> . Expert review of anticancer therapy, 2012. <b>12</b> (4): pág. 519-528.                                                                                                                                           |
|    | Benedettini, 2010         | Benedettini, E., et al., <i>Met activation in non-small cell lung cancer is associated with de novo resistance to EGFR inhibitors and the development of brain metastasis</i> . The American journal of pathology, 2010. <b>177</b> (1): pág. 415-423.                                      |
| 35 | Bertotti, 2015            | Bertotti, A. y F. Sassi, <i>Molecular Pathways: Sensitivity and Resistance to Anti-EGFR Antibodies</i> . Clinical Cancer Research, 2015.                                                                                                                                                    |

|    |                  |                                                                                                                                                                                                                                             |
|----|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Birchmeier, 2003 | Birchmeier, C., et al., <i>Met, metastasis, motility and more</i> . Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. <b>4</b> : pág. 915-925.                                                                                                                   |
| 5  | Boccaccio, 2014  | Boccaccio, C., P. Luraghi, y P.M. Comoglio, <i>MET-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors: An Old Liaison Rooted in Colorectal Cancer Stem Cells</i> . 2014. pág. 3647-3651.                                                                |
|    | Bouattour, 2018  | Bouattour, M., et al., <i>Recent developments of c-Met as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma</i> . Hepatology (Baltimore, Md.), 2018. <b>67</b> (3): pág. 1132-1149.                                                          |
| 10 | Bouchard, 2014   | Bouchard, H., C. Viskov, y C. Garcia-Echeverria, <i>Antibody-drug conjugates-a new wave of cancer drugs</i> . Bioorg Med Chem Lett, 2014. <b>24</b> (23): pág. 5357-63.                                                                     |
|    | Brinkmann, 2017  | Brinkmann, U. y R.E. Kontermann, <i>The making of bispecific antibodies</i> . MAbs, 2017. <b>9</b> (2): pág. 182-212.                                                                                                                       |
| 15 | Calvo, 2017      | Calvo, E., et al., <i>Preliminary results from a phase 1 study of the antibody-drug conjugate ABBV-221 in patients with solid tumors likely to express EGFR</i> . Journal of Clinical Oncology, 2017. <b>35</b> (15_supl.): pág. 2510-2510. |
| 20 | Cappuzzo, 2009   | Cappuzzo, F., et al., <i>Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients</i> . J Clin Oncol, 2009. <b>27</b> (10): pág. 1667-74.                                      |
|    | Cardillo, 2015   | Cardillo et al. <i>Sacituzumab Govitecan (IMMU-132), an Anti-Trop-2/SN-38 Antibody-Drug Conjugate: Characterization and Efficacy in Pancreatic, Gastric, and Other Cancers</i> . Bioconjug Chem., 2015, <b>26</b> (5):919-31                |
| 25 | Cecchi, 2012     | Cecchi, F., D.C. Rabe, y D.P. Bottaro, <i>Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy</i> . Expert opinion on therapeutic targets, 2012. <b>16</b> (6): pág. 553-572.                                                         |
| 30 | Chan, 2017       | Chan, D.L.H., et al., <i>Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors for metastatic colorectal cancer</i> . Cochrane Database Syst Rev, 2017. <b>6</b> : pág. CD007047.                                                              |
|    | Chong, 2013      | Chong, C.R. y P.A. Janne, <i>The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer</i> . Nature medicine, 2013. <b>19</b> (11): pág. 1389-1400.                                                                             |
| 35 | Chothia, 1987    | Chothia, C. y Lesk, A.M., <i>Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins</i> . J. Mol. Biol. 1987, <b>196</b> :901-917                                                                                            |

|    |                  |                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Choueiri, 2017   | Choueiri, T.K., et al., <i>Biomarker-Based Phase II Trial of Savolitinib in Patients With Advanced Papillary Renal Cell Cancer</i> . J Clin Oncol, 2017. <b>35</b> (26): pág. 2993-3001.                                                          |
| 5  | Comer, 2018      | Comer, F., C. Gao, y S. Coats, <i>Bispecific and Biparatopic Antibody Drug Conjugates</i> , in <i>Innovations for Next-Generation Antibody-Drug Conjugates</i> , M. Damelin, Editor. 2018, Springer International Publishing: Cham. pág. 267-280. |
| 10 | Corso, 2010      | Corso, S., et al., <i>Activation of HER family members in gastric carcinoma cells mediates resistance to MET inhibition</i> . Molecular Cancer, 2010. <b>9</b> (1): pág. 121.                                                                     |
|    | Cunningham, 2004 | Cunningham, D., et al., <i>Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer</i> . N Engl J Med, 2004. <b>351</b> (4): pág. 337-45.                                                       |
| 15 | De Bacco, 2012   | De Bacco, F., et al., <i>The MET Oncogene Is a Functional Marker of a Glioblastoma Stem Cell Subtype</i> . Cancer research, 2012. <b>72</b> (17): pág. 4537-4550.                                                                                 |
| 20 | de Goeij, 2016   | de Goeij, B.E.C.G. y J. M. Lambert, <i>New developments for antibody-drug conjugate-based therapeutic approaches</i> . Antigen processing * Special section: New concepts in antibody therapeutics, 2016. <b>40</b> : pág. 14-23.                 |
|    | Dimasi, 2017     | Dimasi et al. <i>Efficient Preparation of Site-Specific Antibody-Drug Conjugates Using Cysteine Insertion</i> . Mol Pharmaceuticals, 2017, <b>14</b> (5) 1501-1516                                                                                |
| 25 | Dokala, 2005     | Dokala, A. y S.S. Thakur, <i>Extracellular region of epidermal growth factor receptor: a potential target for anti-EGFR drug discovery</i> . Oncogen, 2016. <b>36</b> : pág. 2337.                                                                |
|    | Domling, 2005    | Domling et al. <i>Myxobacterial epothilones and tubulysins as promising anticancer agents</i> . Mol. Diversity, 2005 <b>9</b> :141-147                                                                                                            |
| 30 | Donaghy, 2016    | Donaghy, H., <i>Effects of antibody, drug and linker on the preclinical and clinical toxicities of antibody-drug conjugates</i> . MAbs, 2016. <b>8</b> (4): pág. 659-71.                                                                          |
|    | Dornan, 2009     | Dornan et al., <i>Therapeutic potential of an anti-CD79b antibody-drug conjugate, anti-CD79b-vc-MMAE, for the treatment of non-Hodgkin lymphoma</i> . Blood, 2009, <b>114</b> (13):2721-2729                                                      |
| 35 | Dubowchik, 2002  | Dubowchik et al., <i>Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal</i>                                                                                                                                                                       |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | <i>release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity</i> , Bioconjugate Chemistry, 2002, 13,855-869                                                     |
| 5  | Engelman, 2007<br>Engelman, J.A., et al., <i>MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling</i> . Science, 2007. <b>316</b> : pág. 1039-1043.                                                                 |
|    | Fan, 2015<br>Fan, G.W., et al., <i>Bispecific antibodies and their applications</i> . Journal of Hematology & Oncology, 2015. <b>8</b> .                                                                                                                    |
| 10 | Garber, 2014<br>Garber, K., <i>MET inhibitors start on road to recovery</i> . Nature reviews.Drug discovery, 2014. <b>13</b> (8): pág. 563-565.                                                                                                             |
|    | Gherardi, 2013<br>Gherardi et al., <i>Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor</i> . Proc Natl Acad Sci U.S.A, 2003, 100(21): 12039-12044                |
| 15 | Giordano, 1989<br>Giordano, S., et al., <i>Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein</i> . Nature, 1989. <b>339</b> : pág. 155-156.                                                                                                 |
|    | Gisterek, 2011<br>Gisterek, I., et al., <i>Prognostic role of c-met expression in breast cancer patients</i> . Rep Pract Oncol Radiother, 2011. <b>16</b> (5): pág. 173-7.                                                                                  |
| 20 | Gou, 2016<br>Gou, L.Y., et al., <i>The coexistence of MET over-expression and an EGFR T790M mutation is related to acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer</i> . Oncotarget, 2016.                    |
| 25 | Gua, 2008<br>Guo, A., et al., <i>Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met</i> . Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. <b>105</b> (2): pág. 692-697.                                                                        |
| 30 | Gua, 2014<br>Guo, B., et al., <i>Prognostic value of MET gene copy number and protein expression in patients with surgically resected non-small cell lung cancer: a meta-analysis of published literatures</i> . PLoS One, 2014. <b>9</b> (6): pág. e99399. |
|    | Hamblett, 2004<br>Hamblett et al., <i>Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate</i> . Clin. Cancer Res., 2004, 10:7063-7070                                                                                 |
| 35 | Haura, 2013<br>Haura, E.B. y M.A. y Smith, <i>Signaling Control by Epidermal Growth Factor Receptor and MET: Rationale for Cotargeting Strategies in Lung Cancer</i> . Journal of Clinical Oncology, 2013. <b>31</b> (32): pág. 4148.                       |

|    |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Hay, 2016        | Hay et al., <i>Targeting CD73 in the tumor microenvironment with MEDI9447</i> . Oncoimmunology, 2016 5(8):e1208875.                                                                                                                                                                        |
|    | Hinrichs, 2015   | Hinrichs, M.J. y R. Dixit, <i>Antibody Drug Conjugates: Nonclinical Safety Considerations</i> . AAPS J, 2015. <b>17</b> (5): pág. 1055-64.                                                                                                                                                 |
| 5  | Huang, 2014      | Huang, L., et al., <i>MET expression plays differing roles in non-small-cell lung cancer patients with or without EGFR mutation</i> . Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 2014. <b>9</b> (5): pág. 725-728. |
| 10 | Jimeno, 2009     | Jimeno, A., et al., <i>KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection</i> . J Clin Oncol, 2009. <b>27</b> (7): pág. 1130-6.                                                                |
|    | Jun, 2013        | Jun, H.J., R.T. Bronson, y A. Charest, <i>Inhibition of EGFR induces a c-MET driven stem cell population in Glioblastoma</i> . Stem cells (Dayton, Ohio), 2013.                                                                                                                            |
| 15 | Junutula, 2008   | Junutula, et al., <i>Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index</i> . Nature Biotech., 2008, 26(8):925-932                                                                                                                                |
| 20 | Junutula, 2016   | Junutula, J.R. y H.P. Gerber, <i>Next-Generation Antibody-Drug Conjugates (ADCs) for Cancer Therapy</i> . ACS Med Chem Lett, 2016. <b>7</b> (11): pág. 972-973.                                                                                                                            |
|    | Kabat, 1991      | Kabat, E.A. et al. <i>Sequences of Proteins of Immunological Interest</i> , 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991                                                                                                                               |
| 25 | Karamouzis, 2009 | Karamouzis, M.V., P.A. Konstantinopoulos, y A.G. Papavassiliou, <i>Targeting MET as a strategy to overcome crosstalk-related resistance to EGFR inhibitors</i> . The Lancet Oncology, 2009. <b>10</b> (7): pág. 709-717.                                                                   |
|    | Kim, 2017a       | Kim, J.H., B.J. Kim, y H. S. Kim, <i>Clinicopathological impacts of high c-Met expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis and review</i> . Oncotarget, 2017. <b>8</b> (68): pág. 113120-113128.                                                                  |
| 30 | Kim, 2017b       | Kim, J.H., B.J. Kim, y H. S. Kim, <i>Clinicopathological impacts of high c-Met expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis and review</i> . Oncotarget, 2017. <b>8</b> (43): pág. 75478-75487.                                                                                     |
| 35 | Kim, 2017c       | Kim, J.H., et al., <i>Prognostic value of c-Met overexpression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis and review</i> . Oncotarget, 2017. <b>8</b> (52): pág. 90351-90357.                                                                                                            |

|    |                   |                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Klein, 2012       | Klein et al. <i>Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies</i> . MAbs, 2012, 4:653-63                                                                                                                 |
| 5  | Knickelbein, 2015 | Knickelbein, K. y L. Zhang, <i>Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer</i> . Genes Dis, 2015. <b>2</b> (1): pág. 4-12.                                                                                    |
|    | Kondo, 2013       | Kondo, S., et al., <i>Clinical impact of c-Met expression and its gene amplification in hepatocellular carcinoma</i> . International journal of clinical oncology, 2013. <b>18</b> (2): pág. 207-213.                                                    |
| 10 | Kontermann, 2015  | Kontermann, R.E. y U. Brinkmann, <i>Bispecific antibodies</i> . Drug Discov Today, 2015. <b>20</b> (7): pág. 838-47.                                                                                                                                     |
|    | Lacouture, 2006   | Lacouture, M.E., <i>Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors</i> . Nature reviews. Cancer, 2006. <b>6</b> (10): pág. 803-812.                                                                                                               |
| 15 | Lambert, 2017     | Lambert, J.M. y C.Q. Morris, <i>Antibody-Drug Conjugates (ADCs) for Personalized Treatment of Solid Tumors: A Review</i> . Adv Ther, 2017. <b>34</b> (5): pág. 1015-1035.                                                                                |
|    | Ledermann, 1991   | Ledermann et al. <i>A phase-I study of repeated therapy with radiolabelled antibody to carcinoembryonic antigen using intermittent or continuous administration of cyclosporin A to suppress the immune response</i> . Int. J. Cancer, 1991, 47: 659-664 |
| 20 | LeFranc, 2015     | LeFranc, M.P. et al., <i>IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on.</i> , Nucleic Acids Res. 2015, 43(Database issue):D413-22.                                                                                             |
| 25 | Li, 2011          | Li, C., et al., <i>c-Met Is a Marker of Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Target</i> . Gastroenterology, 2011. <b>141</b> (6): pág. 2218-2227.e5.                                                                                             |
|    | Liska, 2011       | Liska, D., et al., <i>HGF Rescues Colorectal Cancer Cells from EGFR Inhibition via MET Activation</i> . Clinical Cancer Research, 2011. <b>17</b> (3): pág. 472-482.                                                                                     |
| 30 | Liu, 2015         | Liu, Y., et al., <i>Prognostic value of c-Met in colorectal cancer: a meta-analysis</i> . World J Gastroenterol, 2015. <b>21</b> (12): pág. 3706-10.                                                                                                     |
|    | Lü, 2017          | Lü, Y.F. y Z.M. Wang, <i>Research progress in the technology evolution and action modes of bispecific antibodies</i> . Chinese Journal of New Drugs, 2017. <b>26</b> (20): pág. 2431-2438.                                                               |
| 35 | Luraghi, 2014     | Luraghi, P., et al., <i>MET Signaling in Colon Cancer Stem-like Cells Blunts the Therapeutic Response to EGFR Inhibitors</i> . Cancer                                                                                                                    |

|    |                     |                                                                                                                                                                                                                                               |
|----|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                     | research, 2014. <b>74</b> (6): pág. 1857-1869.                                                                                                                                                                                                |
| 5  | Madoz-Gúrpide, 2016 | Madoz-Gúrpide, J., et al., <i>Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer</i> . 2016. pág. 1-13.                                                               |
|    | Marano, 2015        | Marano, L., et al., <i>c-Met targeting in advanced gastric cancer: An open challenge</i> . Cancer letters, 2015. <b>365</b> (1): pág. 30-36.                                                                                                  |
|    | Mazor, 2017         | Mazor, Y., et al., <i>Enhanced tumor-targeting selectivity by modulating bispecific antibody binding affinity and format valence</i> . Sci Rep, 2017. <b>7</b> : pág. 40098.                                                                  |
| 10 | Mazor, 2015         | Mazor, Y., et al., <i>Insights into the molecular basis of a bispecific antibody's target selectivity</i> . MAbs, 2015. <b>7</b> (3): pág. 461-9.                                                                                             |
| 15 | McDermott, 2010     | McDermott, U., et al., <i>Acquired Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer Cells to MET Kinase Inhibition Is Mediated by a Switch to Epidermal Growth Factor Receptor Dependency</i> . Cancer research, 2010. <b>70</b> (4): pág. 1625-1634. |
|    | Miyamoto, 2011      | Miyamoto, M., et al., <i>Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma</i> . British journal of cancer, 2011. <b>105</b> (1): pág. 131-138.                                                            |
| 20 | Mo, 2017            | Mo, H.N. y P. Liu, <i>Targeting MET in cancer therapy</i> . Chronic Dis Transl Med, 2017. <b>3</b> (3): pág. 148-153.                                                                                                                         |
|    | Moore, 2016         | Moore, S.L., et al., <i>A Novel Bispecific Antibody Targeting EGFR and cMet that is Effective Against EGFR Inhibitor- Resistant Lung Tumors</i> . Cancer research, 2016.                                                                      |
| 25 | Nasiri, 2018        | Nasiri, H., et al., <i>Antibody-drug conjugates: promising and efficient tools for targeted cancer therapy</i> . J Cell Physiol, 2018.                                                                                                        |
|    | Neuberger, 1988     | Neuberger et al., 1988, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799                                                                                                                                                             |
|    | Nicholson, 2001     | Nicholson, R.I., J.M. Gee, y M.E. Harper, <i>EGFR and cancer prognosis</i> . Eur J Cancer, 2001. <b>37</b> : pág. 9-15.                                                                                                                       |
| 30 | Ogitani, 2016a      | Ogitani et al. <i>Wide application of a novel topoisomerase I inhibitor-based drug conjugation technology</i> . Bioorg Med Chem Lett. 2016, <b>26</b> (20):5069-5072                                                                          |
| 35 | Ogitani, 2016b      | Ogitani et al. <i>DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DM1</i> . Clin Cancer Res. 2016,                                   |

|    |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                  | 22(20):5097-5108                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|    | Organ, 2011      | Organ, S.L. y M.S. Tsao, <i>An overview of the c-MET signaling pathway</i> . Therapeutic advances in medical oncology, 2011. <b>3</b> (1 suplemento): pág. S7-S19.                                                                                                                      |
| 5  | Organesyan, 2008 | Organesyan et al. <i>Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions</i> . Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2008;64(Pt 6):700-4.                                                                                                       |
| 10 | Ou, 2016         | Ou, S.-H.I., N. Agarwal, y S.M. Ali, <i>High MET amplification level as a resistance mechanism to osimertinib (AZD9291) in a patient that symptomatically responded to crizotinib treatment post-osimertinib progression</i> . Lung Cancer, 2016. <b>98</b> (Suplemento C): pág. 59-61. |
|    | Pearson, 1988    | Pearson y Lipman, <i>Improved tools for biological sequence comparison</i> . PNAS USA, 1988, 85: 2444-2448                                                                                                                                                                              |
| 15 | Persic, 1997     | Persic et al. <i>An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries</i> . Gene, 1997, 187: 9-18.                                                                                                   |
|    | Peters, 2012     | Peters, S. y A.A. Adjei, <i>MET: a promising anticancer therapeutic target</i> . Nature reviews.Clinical oncology, 2012. <b>9</b> (6): pág. 314-326.                                                                                                                                    |
| 20 | Philips, 2016    | Phillips, A.C., et al., <i>ABT-414, an Antibody–Drug Conjugate Targeting a Tumor-Selective EGFR Epitope</i> . Molecular Cancer Therapeutics, 2016. <b>15</b> (4): pág. 661-669.                                                                                                         |
|    | Philips, 2018    | Phillips, A.C., et al., <i>Characterization of ABBV-221, a Tumor-Selective EGFR Targeting Antibody Drug Conjugate</i> . Mol Cancer Ther, 2018.                                                                                                                                          |
| 25 | Prat, 1991       | Prat, M., et al., <i>The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors</i> . International journal of cancer.Journal international du cancer, 1991. <b>49</b> (3): pág. 323-328.                                          |
| 30 | Puri, 2008       | Puri, N. y R. Salgia, <i>Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer</i> . J Carcinog, 2008. <b>7</b> : pág. 9.                                                                                                                      |
|    | Remon, 2018      | Remon, J., et al., <i>Osimertinib and other third-generation EGFR TKI in EGFR-mutant NSCLC patients</i> . Ann Oncol, 2018. <b>29</b> (suplemento_1): pág. i20-i27.                                                                                                                      |
| 35 | Retter, 2005     | Retter, I., et al., <i>"VBASE2, an integrative V gene database"</i> . Nucl. Acids Res. 2005, 33 (suplemento 1): D671-D674                                                                                                                                                               |

|    |                     |                                                                                                                                                                                                                            |
|----|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Rho, 2009           | Rho, J.K., et al., <i>The role of MET activation in determining the sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors</i> . Molecular cancer research : MCR, 2009. <b>7</b> (10): pág. 1736-1743. |
| 5  | Ridgway, 1996       | Ridgway et al., <i>'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization</i> . Protein Eng., 1996, 9:617-621                                                                           |
| 10 | Rocha-Lima, 2007    | Rocha-Lima, C.M., et al., <i>EGFR targeting of solid tumors</i> . Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center, 2007. <b>14</b> (3): pág. 295-304.                                                                |
|    | Sacco, 2015         | Sacco, J.J. y M.J. Clague, <i>Dysregulation of the Met pathway in non-small cell lung cancer: implications for drug targeting and resistance</i> . Transl Lung Cancer Res, 2015. <b>4</b> (3): pág. 242-52.                |
| 15 | Saltz, 2004         | Saltz, L.B., et al., <i>Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor</i> . J Clin Oncol, 2004. <b>22</b> (7): pág. 1201-8.                |
|    | Sanderson, 2005     | Sanderson et al., <i>In vivo drug-linker stability of an anti-CD30 dipeptide-linked auristatin immunoconjugate</i> . Clin. Cancer Res. 2005, 11:843-852                                                                    |
| 20 | Sau, 2017           | Sau, S., et al., <i>Advances in antibody-drug conjugates: A new era of targeted cancer therapy</i> . Drug Discov Today, 2017. <b>22</b> (10): pág. 1547-1556.                                                              |
| 25 | Sellmann, 2016      | Sellmann, C., et al., <i>Balancing Selectivity and Efficacy of Bispecific EGFR x c-MET Antibodies and Antibody-Drug Conjugates</i> . Journal of Biological Chemistry, 2016.                                                |
|    | Seshacharyulu, 2012 | Seshacharyulu, P., et al., <i>Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy</i> . Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2012. <b>16</b> (1): pág. 15-31.                                                         |
| 30 | Sierra, 2011        | Sierra, J.R. y M.-S. Tsao, <i>c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer</i> . Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2011. <b>3</b> (1 suplemento): pág. S21-S35.                                 |
|    | Smith, 1981         | Smith y Waterman, <i>Identification of common molecular subsequences</i> . J. Mol Biol. 1981, 147: 195-197                                                                                                                 |
| 35 | Sohn, 2014          | Sohn, J., et al., <i>cMET Activation and EGFR-Directed Therapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer</i> . Journal of Cancer, 2014.                                                                                  |

|    |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                  | <b>5(9):</b> pág. 745-753.                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 5  | Suda, 2010       | Suda, K., et al., <i>Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer</i> . Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2010. <b>16(22):</b> pág. 5489-5498. |
| 10 | Thompson, 2016   | Thompson et al. <i>Rational design, biophysical and biological characterization of site-specific antibody-tubulysin conjugates with improved stability, efficacy and pharmacokinetics</i> . J Control Release. 2016, 236:100-16.                                                                          |
| 15 | Tolcher, 2014    | Tolcher, A., et al., <i>342 A phase 1/2 study evaluating the safety, pharmacokinetics and efficacy of ABT-414 in subjects with advanced solid tumors likely to over-express the epidermal growth factor receptor (EGFR)</i> . European Journal of Cancer, 2014. <b>50:</b> pág. 111.                      |
|    | Tolcher, 2014    | Tolcher, A.W., <i>Antibody drug conjugates: lessons from 20 years of clinical experience</i> . Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 2016.                                                                                                                  |
| 20 | Troiani, 2016    | Troiani, T., et al., <i>Therapeutic value of EGFR inhibition in CRC and NSCLC: 15 years of clinical evidence</i> . ESMO open, 2016. <b>1(5):</b> pág. e000088.                                                                                                                                            |
|    | Trusolino, 2010  | Trusolino, L., A. Bertotti, y P. Comoglio, <i>MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer</i> . Nature reviews.Molecular cell biology, 2010. <b>11(12):</b> pág. 834.                                                                                          |
| 25 | Vainshtein, 2015 | Vainshtein et al., <i>Quantitative measurement of the target-mediated internalization kinetics of biopharmaceuticals</i> , Pharm Res., 2015. <b>32:</b> 286–299.                                                                                                                                          |
| 30 | Vaughan, 1996    | Vaughan, et al., <i>Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library</i> , Nat Biotechnol,. 1996. <b>14:</b> pág. 309                                                                                                                             |
|    | Vecchione, 2011  | Vecchione, L., et al., <i>EGFR-targeted therapy</i> . Special Issue - Gastroenterology, 2011. <b>317(19):</b> pág. 2765-2771.                                                                                                                                                                             |
| 35 | Vsiansky, 2018   | Vsiansky, V., et al., <i>Prognostic role of c-Met in head and neck squamous cell cancer tissues: a meta-analysis</i> . Scientific Reports, 2018. <b>8(1):</b> pág. 10370.                                                                                                                                 |
|    | Wang, 2018       | Wang, X. et al., <i>IgG Fc engineering to modulate antibody effector</i>                                                                                                                                                                                                                                  |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | <i>functions</i> Protein Cell. 2018;9(1):63-73                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 5  | Wang, 2017<br>Wang, J., et al., <i>ABBV-399, a c-Met Antibody-Drug Conjugate that Targets Both MET-Amplified and c-Met-Overexpressing Tumors, Irrespective of MET Pathway Dependence</i> . Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2017. <b>23</b> (4): pág. 992-1000. |
| 10 | Wu, 2017<br>Wu, Y.-L., et al., <i>Does c-Met remain a rational target for therapy in patients with EGFR TKI-resistant non-small cell lung cancer?</i> Cancer Treatment Reviews, 2017. <b>61</b> : pág. 70-81.                                                                                                                  |
| 15 | Xu, 2016<br>Xu, Y.P., et al., <i>C-Met as a Molecular Marker for Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Its Association with Clinical Outcome</i> . Journal of Cancer, 2016. <b>7</b> (5): pág. 587-594.                                                                                                                       |
| 20 | Yan, 2015<br>Yan, S., et al., <i>Prognostic significance of c-Met in breast cancer: a meta-analysis of 6010 cases</i> . Diagn Pathol, 2015. <b>10</b> : pág. 62.                                                                                                                                                               |
|    | Zhang, 2016<br>Zhang, Y., Z. Du, y M. Zhang, <i>Biomarker development in MET-targeted therapy</i> . Oncotarget, 2016. <b>7</b> (24): pág. 37370-37389.                                                                                                                                                                         |
|    | Zhang, 2015<br>Zhang, Y.W., <i>Promise and challenges on the horizon of MET-targeted cancer therapeutics</i> . World J Biol Chem, 2015. <b>6</b> (2): pág. 16-27.                                                                                                                                                              |
|    | Zucali, 2008<br>Zucali, P.A., et al., <i>Role of cMET expression in non-small-cell lung cancer patients treated with EGFR tyrosine kinase inhibitors</i> . Annals of Oncology, 2008. <b>19</b> (9): pág. 1605-1612.                                                                                                            |

Para técnicas estándar de biología molecular, véase Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

25

### **ANEXO DE SECUENCIAS**

#### Secuencias de CDR para el clon de anticuerpo anti-EGFR RAA22

HCDR1 – DNDFFS (SEQ ID NO: 1)

HCDR2 – AIVAVFRTETTYAQKFQD (SEQ ID NO: 2)

HCDR3 – RLMSAISGPGAPLLM (SEQ ID NO: 3)

30

LCDR1 – TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 4)

LCDR2 – DVSKRPS (SEQ ID NO: 5)

LCDR3 – SSYTSSDTLEI (SEQ ID NO: 6)

#### Secuencias de CDR para el clon de anticuerpo anti-EGFR QD6

HCDR1 – DNDFFS (SEQ ID NO: 1)

35

HCDR2 – AIVAVVRTETTYAQKFQD (SEQ ID NO: 7)

HCDR3 – RLMSAISGPGAPLLM (SEQ ID NO: 3)

LCDR1 – TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 4)

LCDR2 – DVSERPS (SEQ ID NO: 66)

LCDR3 – FSYTSSDTLEI (SEQ ID NO: 67)

5 Secuencias de FR para clones de anticuerpo anti-EGFR RAA22 y QD6

HFR1 – QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS (SEQ ID NO: 8)

HFR2 – WVRQAPGQGLEWMG (SEQ ID NO: 9)

HFR3 – RVKITADISTRRTTYMELSSLRSEDVAVYYCAR (SEQ ID NO: 10)

HFR4 – WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 11)

10 LFR1 – QSALTQPRSVSGSPGQSVTISC (SEQ ID NO: 12)

LFR2 – WYQQHPGKAPKLMY (SEQ ID NO: 13)

LFR3 – GVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC (SEQ ID NO: 14)

LFR4 – FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 15)

15 Secuencia de aminoácidos de la región pesada variable (VH) del clon de anticuerpo anti-EGFR RAA22 (SEQ ID NO: 16)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSNDNFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVF  
RTETYAQKFQDRVKITADISTRRTTYMELSSLRSEDVAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQGT  
LTVSS

20 Secuencia de ácido nucleico de la región VH del clon de anticuerpo anti-EGFR RAA22 (SEQ ID NO: 17):

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGT  
GAAGGTGTCCTGTAAAGCCAGCGGCGGCACCTTCAGCGACAACGACTTTAGCTGGGTCC  
GACAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGAGCCATCGTGGCCGTGTTCCGGAC  
AGAGACATACGCCAGAAATTCAGGACAGAGTGAAAATCACCGCCGACATCAGCACCA  
25 GAACCACCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC  
GCCAGACGGCTGATGTCTGCCATCTCTGGACCTGGCGCTCCTCTGCTCATGTGGGGACA  
GGGAACACTGGTCACCGTGTCCAGC

30 Secuencia de aminoácidos de la región VH del clon de anticuerpo anti-EGFR QD6 (SEQ ID NO: 18):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSNDNFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVV  
RTETYAQKFQDRVKITADISTRRTTYMELSSLRSEDVAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQGT  
LTVSS

Secuencia de ácido nucleico de la región VH del clon de anticuerpo anti-EGFR QD6 (SEQ ID NO: 19):

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGT  
 GAAGGTGTCCTGTAAAGCCAGCGGCGGCACCTTCAGCGACAACGACTTTAGCTGGGTCC  
 5 GACAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGAGCCATCGTGGCCGTGGTCCGGAC  
 AGAGACATACGCCAGAAATTCCAGGACAGAGTGAAAATCACCGCCGACATCAGCACCA  
 GAACCACCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC  
 GCCAGACGGCTGATGTCTGCCATCTCTGGACCTGGCGCTCCTCTGCTCATGTGGGGACA  
 GGGAACACTGGTCACCGTGTCCAGC

10 Secuencia de aminoácidos de la región ligera variable (VL) del clon de anticuerpo anti-EGFR RAA22 (SEQ ID NO: 20):

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKR  
 PSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSDTLEIFGGGTKLTVL

15 Secuencia de ácido nucleico de la región VL del clon de anticuerpo anti-EGFR RAA22 (SEQ ID NO: 21):

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCA  
 CCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACC  
 AACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACCTCATGATTTATGATGTCAGTAAGCGGCCCTCAG  
 GGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTG  
 20 GGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGTTCATATACAAGCAGCGACACTC  
 TCGAAATATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

Secuencia de aminoácidos de la región VL del clon de anticuerpo anti-EGFR QD6 (SEQ ID NO: 22):

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSER  
 25 PSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCFSYTSSDTLEIFGGGTKLTVL

Secuencia de ácido nucleico de la región VL del clon de anticuerpo anti-EGFR QD6 (SEQ ID NO: 23):

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCA  
 CCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACC  
 30 AACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACCTCATGATTTATGATGTCAGTGAACGGGCCCTCAG  
 GGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTG  
 GGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCTTCTCATATACAAGCAGCGACACTC  
 TCGAAATATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

Secuencias de CDR para el clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL

35 HCDR1 – DYYIH (SEQ ID NO: 24)

HCDR2 – WMNPNSGNTGYAQKFQG (SEQ ID NO: 25)

HCDR3 – GQGYTHS (SEQ ID NO: 26)

LCDR1 – RASEGIYHWLA (SEQ ID NO: 27)

LCDR2 – KASSLAS (SEQ ID NO: 28)

5 LCDR3 – QQYSNYPPT (SEQ ID NO: 29)

Secuencias de FR para el clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL

HFR1 – QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT (SEQ ID NO: 30)

HFR2 – WVRQATGQGLEWMG (SEQ ID NO: 31)

HFR3 – RVTMTRDTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCAR (SEQ ID NO: 32)

10 HFR4 – WGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 33)

LFR1 – DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 34)

LFR2 – WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 35)

LFR3 – GVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYC (SEQ ID NO: 36)

LFR4 – FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 37)

15 Secuencia de aminoácidos de la región pesada variable (VH) del clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL (SEQ ID NO: 38):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYIHWVRQATGQGLEWMGWMPNS  
GNTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCARGQGYTHSWGQGTMTVSS

20 Secuencia de ácido nucleico de la región VH del clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL (SEQ ID NO: 39):

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCAGCGTG  
AAGGTCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATCCACTGGGTCCG  
CCAGGCCACAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATGAACCCCAACAGCGGCAAC  
ACCGGCTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATGACCCGGGACACCAGCATCAG  
25 CACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTG  
CCAGAGGCCAGGGCTACACCCACAGCTGGGGCCAGGGCACCATGGTCACAGTGTCCAG  
C

Secuencia de aminoácidos de la región ligera variable (VL) del clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL (SEQ ID NO: 40):

30 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGV  
PSRFGSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCQQYSNYPPTFGGGTKLEIK

Secuencia de ácido nucleico de la región VL del clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL (SEQ ID NO: 41):

35 GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCACCCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGACAGA  
GTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCGAGGGCATCTACCACTGGCTGGCCTGGTATCAGCA

GAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGCCAGCAGCCTGGCCAGCGGA  
GTCCCTAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCACCGAGTTCACCCTGACCATCAGCAG  
CCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAACTACCCCCCA  
CCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAG

5        Secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada (CH) de inmunoglobulina humana G1 (SEQ ID NO: 42):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
10 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ  
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15        Secuencia de aminoácidos de una región CH de inmunoglobulina humana G1 modificada para incluir la mutación de "botón", mutaciones de cisteína intercatenarias, una cisteína para formar un puente disulfuro estabilizador y con una inserción de cisteína (SEQ ID NO: 43):

Las siguientes sustituciones están subrayadas:

mutación de "botón" (T366W); mutaciones de cisteína intercatenarias (F126C y C219V); mutación de cisteína estabilizadora (S354C); e inserción de cisteína (C239i), donde la  
20 numeración de los residuos es según el índice EU.

ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAPELLGG  
PSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKN  
25 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

30        Secuencia de aminoácidos de una región CH de inmunoglobulina humana G1 modificada para incluir la mutación de "botón", mutaciones de cisteína intercatenarias, una cisteína para formar un puente disulfuro estabilizador y sin una inserción de cisteína (SEQ ID NO: 44):

Las siguientes sustituciones están subrayadas:

mutación de "botón" (T366W); mutaciones de cisteína intercatenarias (F126C y C219V); y mutación de cisteína estabilizadora (S354C); donde la numeración de los residuos es según el índice EU.

35

ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAPELLGG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKN  
 5 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
 FCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de una región CH de inmunoglobulina humana G1 modificada para incluir mutaciones de "ojal", una cisteína para formar un puente disulfuro estabilizador y con una inserción de cisteína (SEQ ID NO: 45):

10 Las siguientes sustituciones están subrayadas:  
 mutaciones de "ojal" (T366S, L368A y Y407V); mutación de cisteína estabilizadora (Y349C); e inserción de cisteína (C239i), donde la numeración de los residuos es según el índice EU.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
 15 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 PSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKN  
 QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV  
 FCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20 Secuencia de aminoácidos de una región CH de inmunoglobulina humana G1 modificada para incluir mutaciones de "ojal", una cisteína para formar un puente disulfuro estabilizador y sin una inserción de cisteína (SEQ ID NO: 46):

Las siguientes sustituciones están subrayadas:  
 mutaciones de "ojal" (T366S, L368A y Y407V); y mutación de cisteína estabilizadora  
 25 (Y349C), donde la numeración de los residuos es según el índice EU.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKN  
 30 QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV  
 FCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de una región constante kappa de inmunoglobulina humana de tipo natural (SEQ ID NO: 47):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
 35 EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de aminoácidos de una región constante kappa de inmunoglobulina humana modificada para incluir sustituciones S121C y C214V (SEQ ID NO: 48):

Las siguientes sustituciones están subrayadas:

S121C y C214V, donde la numeración es según el índice EU

5        RTVAAPSVFIFPPCDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEV

Secuencia de aminoácidos de una región constante lambda de inmunoglobulina humana (SEQ ID NO: 49):

10        GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKNKYAASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL con inserción de cisteína (SEQ ID NO: 50):

Las siguientes sustituciones están subrayadas:

15        mutación de "botón" (T366W); mutaciones de cisteína intercatenarias (F126C y C219V); mutación de cisteína estabilizadora (S354C); e inserción de cisteína (C239i), donde la numeración de los residuos es según el índice EU.

20        QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDYAVYYCARGQGYTHSWGQGTMTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAPELLGGPSCVF

25        LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS

30        VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

25        Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del clon de anticuerpo anti-c-Met B09-GL sin inserción de cisteína (SEQ ID NO: 51):

Las siguientes sustituciones están subrayadas:

30        mutación de "botón" (T366W); mutaciones de cisteína intercatenarias (F126C y C219V); y mutación de cisteína estabilizadora (S354C); donde la numeración de los residuos es según el índice EU.

35        QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDYAVYYCARGQGYTHSWGQGTMTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL

35        FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW  
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV  
 MHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del clon de anticuerpo anti-c-Met B09-

5 GL (SEQ ID NO: 52):

Las siguientes sustituciones están subrayadas:

S121C y C214V, donde la numeración es según el índice EU

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGV  
 PSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDFFATYYCQQYSNYPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPCD  
 10 EQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA  
 DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEV

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-EGFR clon QD6  
 con inserción de cisteína (SEQ ID NO: 53):

Las siguientes sustituciones están subrayadas:

15 mutaciones de "ojal" (T366S, L368A y Y407V); mutación de cisteína estabilizadora  
 (Y349C); e inserción de cisteína (C239i), donde la numeración de los residuos es según el  
 índice EU.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVV  
 RTETYAQKFQDRVKITADISTRRTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQGT  
 20 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
 QSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 PSCVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKN  
 QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV  
 25 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del clon de anticuerpo anti-EGFR  
 QD6 sin inserción de cisteína (SEQ ID NO: 54):

Las siguientes sustituciones están subrayadas:

30 mutaciones de "ojal" (T366S, L368A y Y407V); y mutación de cisteína estabilizadora  
 (Y349C), donde la numeración de los residuos es según el índice EU.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVV  
 RTETYAQKFQDRVKITADISTRRTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQGT  
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
 QSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 35 PSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST

YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKN  
 QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV  
 FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del clon de anticuerpo anti-EGFR QD6

5 (SEQ ID NO: 55):

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSER  
 PSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCFSYTSSDTLEIFGGGTKLTVLGQPKAAPS  
 VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSY  
 LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

10 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-EGFR clon RAA22  
con inserción de cisteína (SEQ ID NO: 56):

Las siguientes sustituciones están subrayadas:

mutaciones de "ojal" (T366S, L368A y Y407V); mutación de cisteína estabilizadora  
 (Y349C); e inserción de cisteína (C239i), donde la numeración de los residuos es según el  
 índice EU.

15 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVF  
 RTETYAQKFQDRVKITADISTRRTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQGT  
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
 QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 20 PSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKN  
 QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV  
 FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del clon de anticuerpo anti-EGFR

25 RAA22 sin inserción de cisteína (SEQ ID NO: 57):

Las siguientes sustituciones están subrayadas:

mutaciones de "ojal" (T366S, L368A y Y407V); y mutación de cisteína estabilizadora  
 (Y349C), donde la numeración de los residuos es según el índice EU.

30 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSDNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVF  
 RTETYAQKFQDRVKITADISTRRTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQGT  
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
 QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
PSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKN

35

QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del clon de anticuerpo anti-EGFR  
RAA22 (SEQ ID NO: 58):

5           QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKR  
PSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYTSSDTLEIFGGGKLTVLGQPKAAPS  
VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSY  
LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

10           Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo anti-EGFR en "EGFR-  
cMET TM" (SEQ ID NO: 59):

Las siguientes sustituciones están subrayadas:

Triple mutación (TM; L234F, L235E y P331S); mutación de "botón" (T366W);  
mutaciones de cisteína intercatenarias (F126C y C219V); mutación de cisteína estabilizadora  
(S354C), donde la numeración de los residuos es según el índice EU.

15           QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNDNFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVF  
RTETYAQKFQDRVKITADISTRRTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQGT  
LVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAPEFEG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
20           TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKN  
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-c-Met en "EGFR-  
cMET TM" (SEQ ID NO: 60):

25           Las siguientes sustituciones están subrayadas:

Triple mutación (TM; L234F, L235E y P331S); mutaciones de "ojal" (T366S, L368A y  
Y407V); y mutación de cisteína estabilizadora (Y349C), donde la numeración de los residuos  
es según el índice EU.

30           QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWRQATGQGLEWMGWMNPNS  
GNTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGQGYTHSWGQGTMTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFL  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS  
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSC

35

AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo anti-EGFR en "EGFR-cMET TM" (SEQ ID NO: 61):

5 Las siguientes sustituciones están subrayadas:

S121C y C214V, donde la numeración es según el índice EU

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKR  
PSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSDTLEIFGGGKLTVLGQPKAAPS  
VTLFPPCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY  
10 LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEVS

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo anti-c-Met en "EGFR-cMET TM" (SEQ ID NO: 62):

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGV  
PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
15 EQLKSGTASVCLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA  
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de aminoácidos de una región CH de inmunoglobulina humana G1 modificada para incluir mutaciones de "botón", una cisteína para formar un puente disulfuro estabilizador, sin una inserción de cisteína y con la TM (SEQ ID NO: 63):

20 Las siguientes sustituciones están subrayadas:

Triple mutación (TM; L234F, L235E y P331S); mutación de "botón" (T366W);  
mutaciones de cisteína intercatenarias (F126C y C219V); mutación de cisteína estabilizadora  
(S354C), donde la numeración de los residuos es según el índice EU.

ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
25 QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSVDKTHTCPPCPAPEFEG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKN  
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30 Secuencia de aminoácidos de una región CH de inmunoglobulina humana G1 modificada para incluir mutaciones de "ojal", una cisteína para formar un puente disulfuro estabilizador, sin una inserción de cisteína y con la TM (SEQ ID NO: 64):

Las siguientes sustituciones están subrayadas:

35

Triple mutación (TM; L234F, L235E y P331S); mutaciones de "ojo" (T366S, L368A y Y407V); y mutación de cisteína estabilizadora (Y349C), donde la numeración de los residuos es según el índice EU.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
 5 QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEG  
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKN  
 QVSLSCA~~A~~VKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV  
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 Secuencia de aminoácidos de una región constante lambda de inmunoglobulina humana modificada para incluir sustituciones S121C y C214V (SEQ ID NO: 65):

GQPKAAPSVTLFPPCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTTTP  
 SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEVS

15 Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de EGFR humano (SEQ ID NO: 68):

LEEKKVCQGTSNKLTLGLTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTI  
 QEVAGYVLIANTVERIPLNQLIIRGNMYEYNSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGA  
 VRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLSGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENC  
 QKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPLM  
 20 LYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVDHGSVCVRACGADSYEMEEDGVRKCKK  
 CEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDI  
 LKTVEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGD  
 VIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDC  
 VSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHY  
 25 IDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPS

Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de EGFR de macaco cynomolgus (SEQ ID NO: 69):

LEEKKVCQGTSNKLTLGLTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTI  
 QEVAGYVLIANTVERIPLNQLIIRGNMYEYNSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGA  
 30 VRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSEFLSNMSMDFQNHLSGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENC  
 QKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPLM  
 LYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVDHGSVCVRACGADSYEMEEDGVRKCKK  
 CEGPCRKVCNGIGIGEFKDTLSINATNIKHFKNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDI  
 LKTVEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGD  
 35 VIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSSQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDC

VSCQNVSRGRECVDKCNILEGEPREFVENSECIQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAHYI  
DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCARNGPKIPS

Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de c-Met humana (SEQ ID NO: 70):

5       ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAE  
YKTGPVLEHPDCFCQDCSSKANLSGGVWKNINMALVVDYYDDQLISCGSVNRGTCQRH  
VFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPD  
HPLHSISVRRLKETKDGMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDAT  
FHTRIIRFCSINSLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQIGASLN  
10       DDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKYVNDFFNKIVNKNVRLQHFYGPNHEHCFNR  
TLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGLTIANLGTSEGRFMQ  
VVVSRSGPSTPHVNFLDSDHPVSPEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQ  
CLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQQICLPAIYKVPNSAPLEGGTRLTICGWDFGF  
RRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMTNLKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTTQYSTFSY  
15       VDPVITSISPKYGPMAGGTLTTLTGNYNLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEF  
AVKLKIDLANRETSIFSREDPIVYIEHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNF  
TVACQHRSNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGLSKYFDLIYVHNPVFKPFKEKPVMS  
MGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKNKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAI  
SSTVLGKVIVQPDQNFT

20       Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de c-Met de macaco cynomolgus (SEQ ID NO: 71):

ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETAIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAE  
YKTGPVLEHPDCFCQDCSSKANLSGGVWKNINMALVVDYYDDQLISCGSVNRGTCQRH  
VFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPNQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPH  
25       HPLHSISVRRLKETKDGMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYIHAFESNNFIYFLTVQRETINAQT  
FHTRIIRFCSLNSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQIGASLN  
DDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKYVNDFFNKIVNKNVRLQHFYGPNHEHCFNR  
TLLRNSSGCEARRDEYRAEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFVKGLTIANLGTSEGRFM  
QVVVSRSGPSTPHVNFLDSDHPVSPEVIVEHPLNQNNGYTLVVTGKKITKIPLNGLGCRHFQSC  
30       SQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECPSGTWTQQICLPAIYKVFPTSAPLEGGTRLTICGWDF  
GFRRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMTNLKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTTQYST  
FSYVDPIITSISPKYGPMAGGTLTTLTGNYNLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTIS  
TEFAVKLIDLANRETSIFSREDPIVYIEHPTKSFISGGSTITGVGKNLHSVSVPRMVINVHEAG  
RNFTVACQHRSNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGLSKYFDLIYVHNPVFKPFKEKPV

MISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWK  
QAISSTVLGKVIVQPDQNFT

5

10

15

20

25

30

35