

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3074424 DAL TITOLO:

"COSTRUTTI BISPECIFICI LEGANTI L'ANTIGENE CHE INDIVIDUANO HER2"

DEPOSITATA IL:

** * **

DESCRIZIONE

CONTESTO

La maggior parte delle terapie con anticorpi attualmente commercializzate è costituita da anticorpi monospecifici bivalenti ottimizzati e selezionati per legame ad alta affinità e avidità conferiti dai due domini leganti l'antigene. Defucosilazione o potenziamento del legame FcγR mediante mutagenesi sono stati impiegati per rendere gli anticorpi più efficaci tramite meccanismi di citotossicità cellulare dipendenti dall'anticorpo Fc. Anticorpi afucosilati o anticorpi con legame FcγR aumentato risentono ancora di un'efficacia terapeutica incompleta nei test clinici e per tutti questi anticorpi deve ancora essere raggiunto lo stato di farmaco commercializzato.

Gli anticorpi terapeutici idealmente possono presentare alcune caratteristiche minime, incluse specificità target, biostabilità, biodisponibilità e biodistribuzione a seguito della somministrazione a un paziente soggetto, e affinità di legame al target sufficiente ed elevata occupazione del target per massimizzare gli effetti terapeutici dipendenti dall'anticorpo. Tipicamente, gli anticorpi terapeutici sono monospecifici. Tuttavia, il targeting monospecifico non riguarda altri epitopi target che possono essere rilevanti nella segnalazione e nella patogenesi della malattia, consentendo resistenza ai farmaci e meccanismi di fuga. Alcuni degli attuali paradigmi terapeutici richiedono l'uso di una combinazione di due anticorpi terapeutici monospecifici che individuano due epitopi differenti dello stesso antigene target. Un esempio è l'uso di una combinazione di Trastuzumab e Pertuzumab, che individuano entrambi la proteina recettore di Her2 sulla superficie di alcune cellule cancerose. Anticorpi terapeutici che individuano HER2 sono divulgati in WO 2012/143523 per GenMab e WO 2009/154651 per Genentech. WO 2012/143523, per esempio, descrive anticorpi bispecifici che comprendono regioni leganti l'antigene che si legano a due epitopi differenti del recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano (HER2), e composizioni e molecole correlate a base di anticorpi, insieme a composizioni farmaceutiche comprendenti anticorpi e metodi di preparazione e uso degli anticorpi. Gli anticorpi sono anche descritti in WO 2009/068625 e WO 2009/068631.

Domande di brevetto in comproprietà PCT/CA2011/001238 (pubblicata come WO 2012/058768), depositata il 4 novembre 2011, PCT/CA2012/050780 (pubblicata come WO 2013/063702), depositata il 2 novembre 2012, PCT/CA2013/00471 (pubblicata come WO 2013/166594, depositata il 10 maggio 2013, e PCT/CA2013/050358 (pubblicata come WO 2013/166604), depositata l'8 maggio 2013 descrivono anticorpi

terapeutici.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

L'invenzione è definita dalle rivendicazioni.

L'invenzione fornisce un costrutto legante l'antigene secondo la rivendicazione 1 e una composizione farmaceutica comprendente il costrutto legante l'antigene secondo la rivendicazione 10. La composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 10 è fornita per l'uso in medicina secondo la rivendicazione 11. Il costrutto legante l'antigene o composizione farmaceutica è anche fornito/a per l'uso in un metodo di trattamento di un cancro HER2+ secondo la rivendicazione 12. L'invenzione fornisce anche un metodo di rilevamento o misurazione di HER2 in un campione comprendente far entrare a contatto il campione con il costrutto legante l'antigene secondo la rivendicazione 19. La rivendicazione 20 fornisce un metodo *in vitro* di uccisione o inibizione della crescita di un tumore che esprime HER2 usando il costrutto legante l'antigene dell'invenzione. Un metodo di produzione del costrutto legante l'antigene, un polinucleotide isolato o un insieme di polinucleotidi che codificano il costrutto legante l'antigene e un vettore o un insieme di vettori comprendenti uno o più polinucleotidi, e una cellula isolata comprendente uno o più polinucleotidi o uno o più vettori sono forniti secondo le rivendicazioni 23, 24, 26 e 27 insieme a un kit comprendente il costrutto e istruzioni per l'uso secondo la rivendicazione 28.

Il costrutto legante l'antigene è un costrutto bivalente legante l'antigene che si lega a HER2. Il costrutto legante l'antigene comprende:

un primo costrutto polipeptidico legante l'antigene che si lega in modo monovalente e specificamente a un antigene di ECD2 (dominio extracellulare 2) di HER2 (recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano) su una cellula che esprime HER2 e un secondo costrutto polipeptidico legante l'antigene che si lega in modo monovalente e specificamente a un antigene ECD4 (dominio extracellulare 4) di HER2 su una cellula che esprime HER2, in cui:

- (i) il primo costrutto polipeptidico legante l'antigene è un Fab e comprende un primo polipeptide variabile di catena pesante VH1 comprendente VH del costrutto polipeptidico legante ECD2 di SEQ ID NO:221 (v7091) e un primo polipeptide variabile di catena leggera VL1 comprendente il VL del costrutto polipeptidico legante ECD2 di SEQ ID NO:35 (v7091), e il secondo costrutto polipeptidico legante l'antigene è uno scFv e comprende un secondo polipeptide variabile di catena pesante VH2 comprendente il VH del costrutto polipeptidico legante ECD4 di SEQ ID NO: 305 (v7091) e un secondo polipeptide variabile di catena leggera VL2 comprendente il VL del costrutto polipeptidico legante ECD4 di SEQ ID NO:297 (v7091); o
- (ii) il primo costrutto polipeptidico legante l'antigene è un Fab e comprende un primo polipeptide variabile di catena pesante VH1

comprendente il VH del costruito polipeptidico legante ECD2 di SEQ ID NO:99 (v10000) e un primo polipeptide variabile di catena leggera VL1 comprendente il VL del costruito polipeptidico legante ECD2 di SEQ ID NO:71 (v10000), e il secondo costruito polipeptidico legante l'antigene è uno scFv e comprende un secondo polipeptide variabile di catena pesante VH2 comprendente il VH del costruito polipeptidico legante ECD4 di SEQ ID NO: 305 (v10000) e un secondo polipeptide variabile di catena leggera VL2 comprendente il VL del costruito polipeptidico legante ECD4 di SEQ ID NO:297 (v10000);

un primo e un secondo polipeptide linker, in cui il primo e il secondo polipeptide linker comprendono ciascuno un polipeptide della regione cerniera dell'immunoglobulina selezionato tra una regione cerniera delle IgG1, IgG2 o IgG4, in cui il primo polipeptide linker è collegato operativamente al primo costruito polipeptidico legante l'antigene e il secondo polipeptide linker è collegato operativamente al secondo costruito polipeptidico legante l'antigene,

in cui i polipeptidi linker sono collegati in modo covalente tra loro,

e in cui i polipeptidi linker sono collegati operativamente a una regione di Fc eterodimerico;

in cui il costruito legante l'antigene ha la capacità di mediare L'ADCC.

In alcune forme di realizzazione, l'Fc eterodimerico comprende una o più modifiche nella sequenza CH3 che favoriscono la formazione di un eterodimero con stabilità paragonabile a un Fc omodimerico wild-type.

Il costruito legante l'antigene secondo l'invenzione è esemplificato dal costruito "v7091" e dal costruito "v10000". Riferimenti ad altri costrutti che ricadono all'esterno dell'ambito della rivendicazione sono destinati al riferimento e all'illustrazione e non fanno parte dell'invenzione rivendicata.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La Figura 1A rappresenta la struttura di un anticorpo biparatopico in un formato Fab-Fab. Le Figure da 1B a 1E rappresentano la struttura di possibili versioni di un anticorpo biparatopico in un formato scFv-Fab. Nella Figura 1B, il dominio legante l'antigene 1 è uno scFv, fuso alla Catena A, mentre il dominio legante l'antigene 2 è un Fab, fuso alla Catena B. Nella Figura 1C, il dominio legante l'antigene 1 è un Fab, fuso alla Catena A, mentre il dominio legante l'antigene 2 è uno scFv, fuso alla Catena B. Nella Figura 1D, il dominio legante l'antigene 2 è un Fab, fuso alla Catena A, mentre il dominio legante l'antigene 1 è uno scFv, fuso alla Catena B. Nella Figura 1E, il dominio legante l'antigene 2 è uno scFv, fuso alla Catena A, mentre il dominio legante l'antigene 1 è un Fab, fuso alla Catena B. Nella Figura 1F, entrambi i domini leganti l'antigene sono scFv.

La Figura 2 rappresenta la caratterizzazione dell'espressione e della purificazione di anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi. La

Figura 2A e la Figura 2B rappresentano il cromatogramma SEC dell'anticorpo purificato con proteina A e l'analisi SDS-PAGE non riducente dell'espressione 10L e purificazione di v5019. La Figura 2C rappresenta l'analisi SDS-PAGE di un'espressione 25L e purificazione di v10000.

La Figura 3 rappresenta i risultati dell'analisi UPLC-SEC di anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi purificati mediante proteina A e SEC. La Figura 3A mostra i risultati per v5019, in cui il riquadro superiore mostra i risultati della purificazione e il riquadro inferiore mostra lo stesso risultato con una scala espansa per l'asse delle y. Un riepilogo dei dati ottenuti è fornito sotto i risultati UPLC-SEC. La Figura 3B mostra i risultati per v10000.

La Figura 4 rappresenta l'analisi LCMS della purezza eterodimerica di anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi. La Figura 4A rappresenta i risultati dall'analisi LC-MS delle frazioni SEC raggruppate di v5019. La Figura 4B rappresenta i risultati dall'analisi LC-MS delle frazioni di proteina A raggruppate di v10000.

La Figura 5 rappresenta l'analisi di una preparazione su scala 25L di un anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo. La Figura 5A rappresenta il profilo SDS-PAGE di un anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo, dopo purificazione SP FF con MabSelect™ e HiTrap™. La Figura 5B rappresenta l'analisi LCMS dell'anticorpo purificato.

La Figura 6 confronta la capacità di anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi di legarsi a cellule intere HER2+ che mostrano una densità di recettore HER2 differente rispetto ad anticorpi di controllo, come misurato mediante FACS. La Figura 6A e la Figura 6E rappresentano il legame alle cellule SKOV3; la Figura 6B rappresenta il legame alle cellule JIMT1; la Figura 6C e la Figura 6F rappresentano il legame alle cellule MCF7; la Figura 6D rappresenta il legame alle cellule MDA-MB-231; e la Figura 6G rappresenta il legame alle cellule WI-38.

La Figura 7 rappresenta la capacità di anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi di inibire la crescita di cellule HER2+. La Figura 7A e la Figura 7D mostrano l'inibizione della crescita nelle cellule SKOV3; la Figura 7B mostra l'inibizione della crescita nelle cellule BT-474; la Figura 7C mostra l'inibizione della crescita nelle cellule SKBR3 e la Figura 7E mostra l'inibizione della crescita nelle cellule JIMT-1.

La Figura 8 rappresenta i dati di legame di SPR relativi ai paratopi di un anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo. La Figura 8A illustra i valori K_D (nM) di un anticorpo anti-Her2 monovalente (v1040; rappresentante il dominio legante l'antigene su CH-B di un anticorpo biparatopico anti-Her2 esemplificativo), per il legame a ECD di Her2 immobilizzato o Her2-Fc dimerico. La Figura 8B illustra i valori K_D (nM) di un anticorpo anti-Her2 monovalente (v4182; rappresentante il dominio legante l'antigene su CH-A di un anticorpo biparatopico anti-Her2 esemplificativo) per il legame a ECD di Her2 immobilizzato o Her2-Fc dimerico.

La Figura 9 rappresenta la capacità di un anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo di internalizzarsi nelle cellule HER2+. La

Figura 9A rappresenta l'internalizzazione nelle cellule BT-474, mentre la Figura 9B rappresenta l'internalizzazione nelle cellule JIMT-1.

La Figura 10 rappresenta il legame di superficie e l'internalizzazione di anticorpi bivalenti anti-HER2 esemplificativi. La Figura 10A (v5019) rappresenta il risultato nelle cellule BT-474; la Figura 10B (v5019) e la Figura 10F (v5019 e v10000) rappresentano il risultato nelle cellule JIMT1; la Figura 10C (v5019) e la Figura 10B (v5019 e v10000) rappresentano il risultato nelle cellule SKOV3 e la Figura 10D (v5019) rappresenta il risultato nelle cellule MCF7.

La Figura 11 rappresenta la capacità di un anticorpo bivalente anti-HER2 esemplificativo di mediare l'ADCC nelle cellule SKOV3. Nella Figura 11A, il saggio è stato eseguito usando un rapporto tra cellule effettrici e cellule target di 5:1; nella Figura 11B il saggio è stato eseguito usando un rapporto tra cellule effettrici e cellule target di 3:1 e nella Figura 11C il saggio è stato eseguito usando un rapporto tra cellule effettrici e cellule target di 1:1.

La Figura 12 rappresenta la caratterizzazione della cinetica di affinità e legame di un anticorpo anti-HER2 monovalente (v630 e v4182) e di un anticorpo anti-HER2 bivalente esemplificativo (v5019) a HER2 umano ricombinante. La Figura 12A mostra la misurazione di k_a (1/Ms). La Figura 12B mostra la misurazione di k_d (1/s). La Figura 12C mostra la misurazione di K_D (M).

La Figura 13 rappresenta le caratteristiche di affinità e legame di un anticorpo anti-HER2 bivalente esemplificativo a HER2 umano ricombinante su un intervallo di livelli di cattura dell'anticorpo. La Figura 13A rappresenta la misurazione di k_d (1/s) su ECD di HER2 determinata in un intervallo di livelli di cattura dell'anticorpo per un anticorpo anti-HER2 bivalente esemplificativo (v5019). La Figura 13B rappresenta la misurazione di k_d (1/s) su ECD di HER2 determinata su un intervallo di livelli di cattura dell'anticorpo per un anticorpo anti-HER2 monovalente (v4182). La Figura 13C rappresenta la misurazione di k_d (1/s) su ECD di HER2 determinata su un intervallo di livelli di cattura dell'anticorpo per un anticorpo anti-HER2 monovalente (v630).

La Figura 14 mostra un confronto del meccanismo di legame di un anticorpo anti-ECD4 HER2 monospecifico (a sinistra) e di un anticorpo HER2 ECD4 anti-ECD2x bivalente Fab-scFv (a destra). L'anticorpo anti-ECD4 HER2 monospecifico è in grado di legare una molecola di anticorpo a due molecole di HER2; mentre l'anticorpo HER2 ECD4 anti-ECD2x bivalente è in grado di legare un anticorpo a due molecole di HER2, nonché 2 anticorpi a una molecola di HER2 e combinazioni al suo interno che hanno come risultato la reticolazione e la formazione reticolare del recettore HER2 seguite da effetti biologici a valle come l'internalizzazione e/o l'inibizione della crescita come indicato dalle frecce. IEC rappresenta "cellule immunitarie effettrici". I quattro domini extracellulari di HER2 sono numerati come 1, 2, 3, o 4 dove 1 = ECD1, 2 = ECD2, 3 = ECD3 e 4 = ECD4.

La Figura 15 rappresenta l'effetto di un anticorpo biperatopico anti-HER2 esemplificativo sulla fosforilazione di AKT nelle cellule BT-474.

La Figura 16 rappresenta l'effetto di un anticorpo biperatopico anti-HER2 esemplificativo sulla vitalità dei cardiomiociti. La Figura 16A rappresenta l'effetto di v5019 e dell'ADC corrispondente v6363 sulla vitalità dei cardiomiociti; la Figura 16B rappresenta l'effetto di v5019, v7091 e v10000 e dei corrispondenti ADC v6363, 7148, 10553 sulla vitalità dei cardiomiociti, e la Figura 16C rappresenta l'effetto di v5019, v7091 e v10000 e corrispondenti ADC v6363, 7148, 10553 sulla vitalità dei cardiomiociti pretrattati con doxorubicina.

La Figura 17 rappresenta la capacità di coniugati farmaco-anticorpo biperatopici anti-HER2 esemplificativi di inibire la crescita delle cellule HER2+. La Figura 17A mostra la capacità dell'ADC v6363 di inibire la crescita delle cellule JIMT1. La Figura 17B mostra la capacità dell'ADC v6363 di inibire la crescita delle cellule SKOV3. La Figura 17C mostra la capacità dell'ADC v6363 di inibire la crescita delle cellule MCF7. La Figura 17D mostra la capacità dell'ADC v6363 di inibire la crescita delle cellule MDA-MB-231. La Figura 17E mostra la capacità dell'ADC v6363, v10553 e v1748 di inibire la crescita delle cellule SKOV3. La Figura 17F mostra la capacità dell'ADC v6363, v10553 e v1748 di inibire la crescita delle cellule JIMT-1. La Figura 17G mostra la capacità degli ADC v6363, v10553 e v1748 di inibire la crescita delle cellule NCI-N87.

La Figura 18 rappresenta l'effetto di un anticorpo anti-HER2 biperatopico in un modello di xenotrapianto di linea di cancro ovarico umano (SKOV3). La Figura 18A mostra l'effetto dell'anticorpo sul volume medio del tumore. La Figura 18B mostra l'effetto dell'anticorpo sulla percentuale di sopravvivenza degli animali.

La Figura 19 rappresenta l'effetto di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC) anti-HER2 biperatopico in un modello di xenotrapianto di linea di cancro ovarico umano (SKOV3). La Figura 19A mostra l'effetto dell'anticorpo sul volume medio del tumore. La Figura 19B mostra l'effetto dell'anticorpo sulla percentuale di sopravvivenza degli animali.

La Figura 20 rappresenta l'effetto di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC) anti-HER2 biperatopico sul volume medio del tumore in un modello di xenotrapianto di cellule primarie di mammella umane (HBCx-13b).

La Figura 21 rappresenta l'effetto di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC) anti-HER2 biperatopico sul volume medio del tumore in un modello di xenotrapianto di cellule primarie di mammella umane (T226).

La Figura 22 rappresenta l'effetto di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC) anti-HER2 biperatopico sul volume medio del tumore in un modello di xenotrapianto di cellule primarie di mammella umane (HBCx-5).

La Figura 23 rappresenta l'effetto di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC) anti-HER2 biperatopico su tumori resistenti a trattamento

con anti-HER2 in un modello di xenotrapianto di linea cellulare umana (SKOV3).

La Figura 24 rappresenta l'effetto di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC) anti-HER2 biparatopico su tumori resistenti a trattamento con anti-HER2 in un modello di xenotrapianto di cellule primarie umane (HBCx-13b).

La Figura 25 rappresenta la stabilità termica di anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi. La Figura 25A rappresenta la stabilità termica di v5019. La Figura 25B rappresenta la stabilità termica di v10000. La Figura 25C rappresenta la stabilità termica di v7091.

La Figura 26 rappresenta la stabilità termica di coniugati farmaco-anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativi. La Figura 26A rappresenta la stabilità termica di v6363. La Figura 26B rappresenta la stabilità termica di v10553. La Figura 26C rappresenta la stabilità termica di v7148.

La Figura 27 rappresenta la capacità degli anticorpi biparatopici anti-HER2 di mediare l'ADCC nelle cellule HER2+. La legenda mostrata nella Figura 27C si applica alla Figura 27A e alla Figura 27B. La Figura 27A rappresenta questa capacità nelle cellule SKBR3; la Figura 27B rappresenta questa capacità nelle cellule JIMT-1; la Figura 27C rappresenta questa capacità nelle cellule MDA-MB-231; e la Figura 27D rappresenta questa capacità nelle cellule WI-38.

La Figura 28 rappresenta l'effetto dell'afucosilazione sulla capacità degli anticorpi biparatopici anti-HER2 di mediare l'ADCC. La legenda mostrata nella Figura 28B si applica anche alla Figura 28A. La Figura 28A confronta la capacità di una versione afucosilata di v5019 di mediare l'ADCC con quella di Herceptin™ nelle cellule SKOV3. La Figura 28B confronta la capacità di una versione afucosilata di v5019 di mediare l'ADCC con quella di Herceptin™ nelle cellule MDA-MB-231. La Figura 28C confronta la capacità di v10000 e di una versione afucosilata di v10000 di mediare l'ADCC rispetto a quella di Herceptin™ nelle cellule ZR-75-1.

La Figura 29 rappresenta la capacità di v5019 di inibire la crescita delle cellule BT-474 in presenza o in assenza di ligandi stimolatori della crescita.

La Figura 30 rappresenta l'effetto di una versione afucosilata di v5019 (v7187) sul volume tumorale in un modello di xenotrapianto di cancro mammario umano (HBCx13B).

La Figura 31 rappresenta la capacità degli anticorpi biparatopici anti-HER2 e degli ADC biparatopici anti-HER2 di legarsi alle cellule tumorali HER2+. La Figura 31A confronta il legame di v6363 con un analogo di T-DM1, v6246, nelle cellule SKOV3. La Figura 31B confronta il legame di v6363 con un analogo di T-DM1, v6246, nelle cellule JIMT-1. La Figura 31C confronta il legame di svariati anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi e ADC biparatopici anti-HER2 con i controlli nelle cellule SKOV3. La Figura 31D confronta il legame di svariati anticorpi

biparatopici anti-HER2 esemplificativi e ADC biparatopici anti-HER2 con i controlli nelle cellule JIMT-1.

La Figura 32 rappresenta l'inibizione della crescita tumorale dose-dipendente di un ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo in un modello di xenotrapianto ricavato da paziente HER2 3+ (ER-PR negativo) (HBCx13b). La Figura 32A mostra l'effetto di v6363 sul volume tumorale, mentre la Figura 32B mostra l'effetto sulla percentuale di sopravvivenza.

La Figura 33 rappresenta l'effetto di ADC anti-HER2 biparatopico v6363 rispetto alle combinazioni di standard di cura in un modello di xenotrapianto di PDX HBCx-13b resistente a Trastuzumab.

La Figura 33A rappresenta l'effetto del trattamento sul volume tumorale, mentre la Figura 33B rappresenta l'effetto del trattamento sulla sopravvivenza.

La Figura 34 rappresenta l'efficacia di un ADC anti-HER2 biparatopico in un modello di xenotrapianto tumorale derivato da cellule di cancro mammario resistente a trastuzumab HER2+ (JIMT-1).

La Figura 35 rappresenta l'efficacia di anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi *in vivo* in un modello di xenotrapianto tumorale derivato da cellule di cancro ovarico sensibile a trastuzumab (SKOV3). La Figura 35A rappresenta l'effetto del trattamento sul volume tumorale, mentre la Figura 35B illustra l'effetto del trattamento sulla sopravvivenza.

La Figura 36 rappresenta l'efficacia dose-dipendente di anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi *in vivo* in un modello di xenotrapianto tumorale derivato da cellule di cancro ovarico sensibile a trastuzumab (SKOV3).

La Figura 37 rappresenta la capacità di un anticorpo biparatopico anti-HER2 e di un ADC biparatopico anti-HER2 di inibire la crescita di linee cellulari che esprimono HER2, e EGFR e/o HER3 ai livelli 3+, 2+ o 1+. La Figura 37A rappresenta la capacità di v10000 di inibire la crescita di linee cellulari selezionate. La Figura 37B rappresenta la capacità di v10553 di inibire la crescita di linee cellulari selezionate.

La Figura 38 rappresenta un riepilogo della capacità di v10000 e v10553 di inibire la crescita in un gruppo di linee cellulari. Valori con trattino (per esempio 1/2) indicano livelli discrepanti di recettore erbb come riportato nella letteratura; i valori IHC di erbb sono stati ottenuti internamente o dalla letteratura. Laddove non è riportato alcun valore, le quantità di recettore sono sconosciute e/o non riportate. * Stima del livello IHC basata sui dati di espressione del gene erBb2 (Crown BioSciences). I riferimenti numerati sono descritti di seguito.

La Figura 39 rappresenta la capacità di v10000 di mediare l'ADCC nelle cellule HER2+. La Figura 39A rappresenta i risultati nelle cellule FaDu. La Figura 39B rappresenta i risultati nelle cellule A549. La Figura 39C rappresenta i risultati nelle cellule BxPC3. La Figura 39D rappresenta i risultati nelle cellule MiaPaca2.

La Figura 40 rappresenta la capacità degli anticorpi biparatopici anti-HER2 di mediare l'ADCC nelle cellule HER2+. La Figura 40A rappresenta i risultati nelle cellule A549. La Figura 40B rappresenta i risultati nelle cellule NCI-N87. La Figura 40C rappresenta i risultati nelle cellule HCT-116.

La Figura 41 rappresenta l'effetto del formato di anticorpo biparatopico anti-HER2 sul legame delle cellule HER2+. La Figura 41A rappresenta l'effetto del formato sul legame delle cellule BT-474. La Figura 41B rappresenta l'effetto del formato sul legame delle cellule JIMT-1. La Figura 41C rappresenta l'effetto del formato sul legame delle cellule MCF7. La Figura 41D rappresenta l'effetto del formato sul legame delle cellule MDA-MB-231.

La Figura 42 rappresenta l'effetto del formato dell'anticorpo biparatopico anti-HER2 sull'internalizzazione dell'anticorpo nelle cellule HER2+. La Figura 42A rappresenta l'effetto sull'internalizzazione nelle cellule BT-474. La Figura 42B rappresenta l'effetto sull'internalizzazione nelle cellule JIMT-1. La Figura 42C rappresenta l'effetto sull'internalizzazione nelle cellule MCF7.

La Figura 43 rappresenta l'effetto del formato di anticorpo biparatopico anti-HER2 sulla capacità di mediare l'ADCC nelle cellule HER2+. La Figura 43A rappresenta l'effetto nelle cellule JIMT-1. La Figura 43B rappresenta l'effetto nelle cellule MCF7. La Figura 43C rappresenta l'effetto nelle cellule tumorali mammarie HER2 0/1+ MDA-MB-231.

La Figura 44 rappresenta l'effetto del formato di anticorpo biparatopico anti-HER2 sulla capacità degli anticorpi di inibire la crescita di cellule tumorali HER2+ nelle cellule BT-474 in presenza o assenza di ligandi stimolatori della crescita.

La Figura 45 rappresenta l'effetto del formato di anticorpo biparatopico anti-HER2 sulla capacità degli anticorpi di inibire la crescita delle cellule SKBR3.

La Figura 46 rappresenta l'effetto del formato di anticorpo biparatopico anti-HER2 sulla capacità degli anticorpi di inibire la crescita delle cellule tumorali HER2+. La Figura 46A rappresenta l'inibizione della crescita nelle cellule SKOV3. La Figura 46B rappresenta l'inibizione della crescita nelle cellule JIMT-1. La Figura 46C rappresenta l'inibizione della crescita nelle cellule MCF7.

La Figura 47 rappresenta un confronto delle caratteristiche di legame degli anticorpi biparatopici anti-HER2 di formato differente misurate mediante SPR. La Figura 47A rappresenta il grafico e l'analisi di regressione lineare per k_d (1/s) a differenti livelli di cattura dell'anticorpo con v6903 e v7091. La Figura 47B rappresenta il grafico e l'analisi di regressione lineare per K_D (M) a differenti livelli di cattura dell'anticorpo con v6903 e v7091.

I riferimenti rinvenuti nella Figura 38 sono i seguenti: 1. Labouret et al. 2012, Neoplasia 14:121-130 ; 2. Ghasemi et al. 2014, Oncogenesis

doi:10.1038/oncsis.2014.31; 3. Gaborit et al. 2011 J Bio Chem, 286:1133-11345; 4. Kimura et al. 2006, Clin Cancer Res; 12:4925-4932; 5. Komoto et al. 2009, Canc Sci; 101:468-473; 6. Cretella et al. 2014, Molecular Cancer 13:143-155; 7. Bunn et al. 2001, Clin Cancer Res; 7:3239-3250; 8. Lewis Phillips et al. 2013, Clin Cancer Res, 20:456-468; 9. McDonagh et al. 2012, 11:582-593; 10. Coldren et al. 2006, Mol Cancer Res:521-528; 11. Cavazzoni et al. 2012 Mol Cancer, 11:91-115; 12. Li et al. 2014, Mol Cancer Res, doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0396; 13. Chmielewski et al. 2004, Immunology, 173:7647-7653; 14. Kuwada et al. 2004, Int J Cancer, 109:291-301; 15. Fujimoto-Ouchi et al. 2007, Clin Chemother Pharmacol, 59:795-805; 16. Chavez-Blanco et al. 2004, BMC Cancer, 4:59; 17. Campiglio et al. 2004, J Cellular Physiology. 198:259-268; 18. Lehmann et al. 2011, J Clin Investigation, 121:2750-2767; 19. Collins et al. 2011, Annals Oncology, 23:1788-1795; 20. Takai et al. 2005, Cancer, 104:2701-2708; 21. Rusnack et al. 2007, Cell Prolif, 40:580-594; 22. Ma et al. 2013, PLOS ONE, 8:e73261-e73261; 23. Meira et al. 2009, British J Cancer, 101:782-791; 24. Hayashi MP28-14 poster; 25. Wang et al. 2005 J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 25:326-8; 26. Makhja et al. 2010. J Clin Oncol 28:1215-1223.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

L'invenzione è definita dalle rivendicazioni. La divulgazione tecnica esposta di seguito può andare oltre l'ambito delle rivendicazioni in alcuni aspetti. Elementi della divulgazione che non rientrano nell'ambito delle rivendicazioni sono forniti a scopo informativo.

Nella presente sono descritti costrutti leganti l'antigene comprendenti un primo costrutto polipeptidico legante l'antigene che si lega in modo monovalente e specificamente a un antigene di ECD2 (dominio extracellulare 2) di HER2 (recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano) su una cellula che esprime HER2 e un secondo costrutto polipeptidico legante l'antigene che si lega in modo monovalente e specificamente a un antigene di ECD4 (dominio extracellulare 4) di HER2 su una cellula che esprime HER2. Come esposto in modo maggiormente dettagliato nella rivendicazione 1, il costrutto polipeptidico legante ECD2 è un Fab e il costrutto polipeptidico legante ECD4 è uno scFv, ciascuno comprendendo le sequenze specificate nella rivendicazione 1. I costrutti leganti l'antigene hanno un Fc dimerico comprendente una sequenza CH3. L'Fc è un eterodimero, che può avere una o più modifiche nella sequenza CH3 che favoriscono la formazione di un eterodimero con stabilità paragonabile a un Fc omodimerico wild-type. In alcune forme di realizzazione, la sequenza CH3 eterodimerica ha una temperatura di fusione (T_m) di 68° C o superiore.

I costrutti leganti l'antigene presentano attività antitumorali in vitro, come (i) la capacità di inibire la crescita di cellule cancerose in presenza o in assenza di stimolazione mediante fattore di crescita epidermico o erregulina, (ii) la capacità di essere internalizzati nelle cellule cancerose e (iii) la capacità di mediare l'uccisione delle cellule effettrici diretta da anticorpi (ADCC). Queste attività in vitro sono osservate sia con il costrutto legante l'antigene nudo, sia con il costrutto legante l'antigene coniugato a maitansina, e a livelli variabili di espressione di HER2 (1+, 2+ e 3+).

Il costrutto legante l'antigene dell'invenzione è nel formato Fab/ScFv, in cui il primo costrutto polipeptidico legante l'antigene è un Fab e il secondo costrutto polipeptidico legante l'antigene è uno scFv.

Nella presente viene dimostrato che il formato (scFv/scFv, scFv/Fab o Fab/Fab) dei costrutti leganti l'antigene è importante nel determinare il suo profilo funzionale. Viene descritto che certi costrutti leganti anti-HER2 presentano una capacità aumentata di essere internalizzati mediante cellule tumorali che esprimono HER2 rispetto a un costrutto legante l'antigene biparatopico di riferimento in cui i costrutti polipeptidici leganti sia ECD2 sia ECD4 sono Fab. Quando i polipeptidi leganti sia ECD2 sia ECD4 sono scFv (il che non è rivendicato), l'internalizzazione avviene in ampia misura mediante cellule tumorali che esprimono HER2 a un livello di 1+, 2+ o 3+ rispetto ai costrutti di affinità equivalente che hanno un formato Fab/scFv (come rivendicato), i quali a loro volta sono internalizzati in modo più efficiente rispetto ai costrutti di affinità equivalente che hanno un formato Fab/Fab. Forme di realizzazione che sono prontamente internalizzate sono buoni candidati per coniugati anticorpo-farmaco, che richiedono l'internalizzazione mediante una cellula tumorale per effettuare l'uccisione.

In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene presentano una potenza aumentata nell'uccisione ADCC di cellule tumorali che esprimono bassi livelli di HER2 rispetto a costrutti di affinità equivalente che hanno un formato Fab/Fab. In una forma di realizzazione, un costrutto legante l'antigene avente un formato Fab/scFv è più potente nell'uccisione ADCC di cellule tumorali che esprimono bassi livelli di HER2 (HER2 0-1+ o 1+) rispetto a un costrutto anti-HER2 avente un formato Fab/Fab, il quale a sua volta è più potente di un costrutto legante l'antigene avente un formato scFv/scFv.

In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti anti-HER2 sono afucosilati. In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti anti-HER2 sono accoppiati a un farmaco. In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti anti-HER2 sono accoppiati a maitansina (DM1) attraverso un linker SMCC.

Nella presente sono descritti anche i costrutti leganti l'antigene anti-HER2 dell'invenzione per l'uso in un metodo di trattamento di un soggetto avente un tumore HER2+ mediante somministrazione del costrutto al soggetto. In alcune forme di realizzazione, il livello di espressione di HER2 sul tumore è 2+ o inferiore. In alcune forme di realizzazione, il costrutto legante l'antigene è coniugato a maitansina. In alcune forme di realizzazione, il tumore è cancro pancreatico, cancro della testa e del collo, cancro gastrico, cancro coloretale, cancro mammario, cancro renale, cancro cervicale, cancro ovarico, cancro endometriale o cancro di derivazione epidermica. In alcune forme di realizzazione, il tumore è (i) un cancro mammario duttale invasivo HER2 3+ negativo al recettore degli estrogeni (ER-), negativo al recettore del progesterone (PR-), resistente a trastuzumab, resistente a chemioterapia, (ii) un cancro mammario infiammatorio HER2 3+ ER-, PR-, resistente a trastuzumab, (iii) un carcinoma duttale invasivo

HER2 3+, ER-, PR- o (iv) un cancro mammario HER2 2+ con gene HER2 amplificato resistente a trastuzumab e pertuzumab.

Il costrutto dell'invenzione è inoltre fornito per l'uso in metodi di inibizione della crescita delle cellule tumorali o uccisione delle cellule tumorali mediante somministrazione dei costrutti leganti l'antigene.

Nella presente viene descritto anche un costrutto di pertuzumab modificato comprendente mutazioni Y96A nella regione VL e T30A/A49G/L70F nella regione VH. Il costrutto di pertuzumab modificato può essere monovalente (non rivendicato) e ha un'affinità da 7 a 9 volte superiore per ECD2 di HER2 rispetto a pertuzumab. Il costrutto di pertuzumab modificato può avere un formato Fab/Fab, un formato Fab/scFv o un formato scFv/scFv.

Costrutti bispecifici leganti l'antigene

Nella presente sono forniti costrutti bispecifici leganti l'antigene che si legano a HER2. Il costrutto bispecifico legante l'antigene include due costrutti polipeptidici leganti l'antigene, ciascuno legante nello specifico un epitopo differente di HER2. Il costrutto legante l'antigene secondo l'invenzione è come definito nella rivendicazione 1. Il costrutto legante l'antigene è ricavato da anticorpi o costrutti leganti l'antigene noti come spiegato negli Esempi. Come descritto in modo maggiormente dettagliato di seguito, il primo costrutto polipeptidico legante l'antigene è un Fab (legame dell'antigene frammento) e il secondo costrutto polipeptidico legante l'antigene è uno scFv (Fv a catena singola). Un altro costrutto polipeptidico legante l'antigene che non è rivendicato è uno sdab (anticorpo a singolo dominio). Il costrutto legante l'antigene include una regione Fc eterodimerica, come esposto nella rivendicazione 1.

Il termine "costrutto legante l'antigene" si riferisce a qualsiasi agente, per esempio, polipeptide o complesso polipeptidico in grado di legarsi a un antigene. In alcuni aspetti, un costrutto legante l'antigene è un polipeptide che si lega specificamente a un antigene di interesse. Un costrutto legante l'antigene può essere un monomero, dimero, multimero, una proteina, un peptide o un complesso di proteina o peptide; un anticorpo, un frammento di anticorpo o un relativo frammento legante l'antigene; un scFv e simili. Un costrutto legante l'antigene può essere un costrutto polipeptidico che è monospecifico, bispecifico o multispecifico. Per esempio, un costrutto legante l'antigene può includere uno o più componenti leganti l'antigene (per esempio, Fab o scFv) collegati a uno o più Fc. Ulteriori esempi di costrutti leganti l'antigene sono descritti di seguito e forniti negli Esempi. Il costrutto legante l'antigene secondo l'invenzione è come definito nella rivendicazione 1.

Il termine "bispecifico" è destinato ad includere qualsiasi agente, per esempio, un costrutto legante l'antigene che ha due frazioni leganti l'antigene (per esempio, costrutti polipeptidici leganti l'antigene), ciascuna con una specificità di legame esclusiva. Per esempio, una prima frazione legante l'antigene si lega a un epitopo su un primo antigene e una seconda frazione legante l'antigene si lega a un epitopo su un secondo antigene. Il

termine "biparatopico", come usato nella presente, si riferisce a un anticorpo bispecifico in cui la prima frazione legante l'antigene e la seconda frazione legante l'antigene si legano a epitopi differenti sullo stesso antigene.

Un costrutto legante l'antigene monospecifico si riferisce a un costrutto legante l'antigene con una specificità di legame. In altri termini, entrambe le frazioni leganti l'antigene si legano allo stesso epitopo sullo stesso antigene. Per esempio, esempi di costrutti leganti l'antigene monospecifici includono trastuzumab, pertuzumab.

Un costrutto legante l'antigene può essere un anticorpo o una relativa porzione legante l'antigene. Come usato nella presente, un "anticorpo" o "immunoglobulina" si riferisce a un polipeptide sostanzialmente codificato da un gene dell'immunoglobulina o da geni dell'immunoglobulina o relativi frammenti che si legano e riconoscono nello specifico un analita (per esempio, antigene). I geni dell'immunoglobulina riconosciuti includono i geni della regione costante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon e mu, nonché i numerosi geni della regione variabile dell'immunoglobulina. Le catene leggere sono classificate come kappa o lambda. La "classe" di un anticorpo o un'immunoglobulina si riferisce al tipo di dominio costante o regione costante posseduto dalla relativa catena pesante. Vi sono cinque principali classi di anticorpi: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM e svariati di questi possono essere ulteriormente divisi in sottoclassi (isotipi), per esempio, **IgG1**, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. I domini costanti di catena pesante che corrispondono alle differenti classi di immunoglobuline sono denominati rispettivamente α , δ , ϵ , γ e μ .

Un'unità strutturale esemplificativa di immunoglobulina (anticorpo) è composta da due coppie di catene polipeptidiche, ciascuna coppia avendo una catena "leggera" (circa 25 kD) e una catena "pesante" (circa 50-70 kD). Il dominio N-terminale di ciascuna catena definisce una regione variabile circa da 100 a 110 o più amminoacidi responsabili principalmente del riconoscimento dell'antigene. Le espressioni variabile di catena leggera (VL) e variabile di catena pesante (VH) si riferiscono rispettivamente a questi domini di catena leggera e pesante. La catena pesante di IgG1 comprende i domini VH, CH1, CH2 e CH3 rispettivamente dal terminale N al terminale C. La catena leggera comprende i domini VL e CL dal terminale N al terminale C. La catena pesante di IgG1 comprende una cerniera tra i domini CH1 e CH2. In alcune forme di realizzazione, i costrutti di immunoglobulina comprendono almeno un dominio di immunoglobulina di IgG, IgM, IgA, IgD o IgE collegato a un polipeptide terapeutico. In alcune forme di realizzazione, il dominio dell'immunoglobulina trovato in un costrutto legante l'antigene fornito nella presente deriva o è derivato da un costrutto a base di immunoglobulina come un diabody o un nanobody. In alcune forme di realizzazione, i costrutti di immunoglobulina descritti nella presente comprendono almeno un dominio di immunoglobulina da un anticorpo a catena pesante come un anticorpo di camélide. In alcune forme di realizzazione, i costrutti di immunoglobulina forniti nella presente comprendono almeno un dominio di immunoglobulina da un anticorpo di mammifero come un anticorpo di bovino, un anticorpo umano, un anticorpo di camélide, un anticorpo di topo o qualsiasi anticorpo chimerico.

L'espressione "regione ipervariabile" o "HVR", come usato nella presente, si riferisce a ciascuna delle regioni di un dominio variabile di anticorpo che sono ipervariabili in sequenza e/o formano anse strutturalmente definite ("anse ipervariabili"). In generale, gli anticorpi nativi a quattro catene comprendono sei HVR; tre nella VH (H1, H2, H3) e tre nella VL (L1, L2, L3). Le HVR comprendono in generale residui amminoacidici delle anse ipervariabili e/o delle regioni determinanti la complementarità (CDR), queste ultime presentando una variabilità di sequenza massima e/o essendo coinvolte nel riconoscimento dell'antigene. Con l'eccezione di CDR1 nel VH, le CDR comprendono in generale i residui amminoacidici che formano le anse ipervariabili. Le regioni ipervariabili (HVR) sono anche denominate "regioni determinanti la complementarità" (CDR) e queste espressioni sono usate nella presente in modo intercambiabile in riferimento a porzioni della regione variabile che formano le regioni leganti l'antigene. Questa particolare regione è stata descritta da Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) e da Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987), in cui le definizioni includono sovrapposizioni o sottoinsiemi di residui amminoacidici quando confrontati l'uno con l'altro. Tuttavia, l'applicazione di ciascuna definizione che si riferisce a una CDR di un anticorpo o relative varianti è destinata ad essere inclusa nell'ambito del termine come definito e usato nella presente. I residui amminoacidici appropriati che comprendono le CDR come definiti da ciascuno dei riferimenti citati sopra sono esposti di seguito nella Tabella 1 come confronto. I numeri esatti dei residui che comprendono una particolare CDR varieranno a seconda della sequenza e della dimensione della CDR. Gli esperti nella tecnica possono determinare di routine quali residui comprendono una particolare CDR data la sequenza amminoacidica della regione variabile dell'anticorpo.

Come usato nella presente, l'espressione "a catena singola" si riferisce a una molecola comprendente monomeri amminoacidici collegati in modo lineare mediante legami peptidici. In alcune forme di realizzazione, uno dei costrutti polipeptidici leganti l'antigene è una molecola Fab a catena singola, vale a dire una molecola Fab in cui la catena leggera di Fab e la catena pesante di Fab sono collegate da un linker peptidico per formare una singola catena peptidica. In una particolare forma di realizzazione, il terminale C della catena leggera di Fab è collegato al terminale N della catena pesante di Fab nella molecola Fab a catena singola. In altre forme di realizzazione, uno dei costrutti polipeptidici leganti l'antigene è una molecola di Fv a catena singola (scFv). Come descritto in modo maggiormente dettagliato nella presente, uno scFv ha un dominio variabile di catena leggera (VL) collegato dal suo terminale C all'estremità N-terminale di un dominio variabile di catena pesante (VH) mediante una catena polipeptidica. In alternativa, lo scFv comprende una catena polipeptidica in cui l'estremità C-terminale della VH è collegata all'estremità N-terminale della VL da una catena polipeptidica.

Costrutto polipeptidico legante l'antigene

Il costrutto bispecifico legante l'antigene comprende due costrutti polipeptidici leganti l'antigene che si legano ciascuno a un particolare

dominio o epitopo di HER2. Il primo costruito polipeptidico legante l'antigene si lega al dominio extracellulare 2 di HER2, ECD2. Il secondo costruito polipeptidico legante l'antigene si lega al dominio extracellulare 4 di HER2, ECD4.

Il formato del costruito bispecifico legante l'antigene determina le caratteristiche funzionali del costruito bispecifico legante l'antigene. Secondo l'invenzione, il costruito bispecifico legante l'antigene ha un formato Fab-scFv (*vale a dire che* il primo costruito polipeptidico legante l'antigene è un Fab e il secondo costruito polipeptidico legante l'antigene è uno ScFv). Un formato alternativo che non è rivendicato è il costruito bispecifico legante l'antigene avente un formato scFv-scFv (*vale a dire che* entrambi i costrutti polipeptidici leganti l'antigene sono scFv).

Il "frammento Fab" (anche denominato frammento legante l'antigene) contiene il dominio costante (CL) della catena leggera e il primo dominio costante (CH1) della catena pesante rispettivamente insieme ai domini variabili VL e VH sulla catena leggera e catena pesante. I domini variabili comprendono le anse determinanti la complementarità (CDR, anche denominate regione ipervariabile) che sono coinvolte nel legame dell'antigene. I frammenti Fab' si differenziano dai frammenti Fab per l'aggiunta di alcuni residui al terminale carbossilico del dominio CH1 della catena pesante, incluse uno o più cisteine dalla regione cerniera dell'anticorpo.

Il "Fv a catena singola" o "scFv" include i domini VH e VL di un anticorpo, in cui questi domini sono presenti in una singola catena polipeptidica. In una forma di realizzazione, il polipeptide Fv comprende inoltre un linker polipeptidico tra i domini VH e VL, che consente a scFv di formare la struttura desiderata per il legame dell'antigene. Per un riesame di scFv si veda Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Volume 113, Rosenberg e Moore Ed., Springer-Verlag, New York, pagine 269-315 (1994). I frammenti scFv di anticorpo HER2 sono descritti in WO93/16185; nel brevetto statunitense n° 5,571,894; e nel brevetto statunitense n° 5,587,458.

Il formato "anticorpi a singolo dominio" o "sdAb" è un singolo dominio di immunoglobulina. Gli sdAb sono abbastanza stabili e semplici da esprimere come partner di fusione con la catena Fc di un anticorpo (Harmsen MM, De Haard HJ (2007). "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments". *Appl. Microbiol Biotechnol.* 77(1): 13-22).

Formato e funzione dei costrutti leganti l'antigene

Nella presente sono forniti costrutti leganti l'antigene biparatopico HER2 aventi due costrutti polipeptidici leganti l'antigene, il primo dei quali si lega specificamente a ECD2 di HER2 e il secondo dei quali si lega specificamente a HER2 di ECD4. Il formato del costruito legante l'antigene è Fab-scFv (rispettivamente primo costruito polipeptidico legante l'antigene-secondo costruito polipeptidico legante l'antigene).

In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene presentano attività antitumorali in vitro, come (i) la capacità di inibire la crescita di cellule cancerose sia in presenza sia in assenza di stimolazione mediante fattore di crescita epidermico o eregulina, (ii) la capacità di essere

internalizzati nelle cellule cancerose (attraverso il legame all'antigene HER2 e causandone l'internalizzazione) e (iii) la capacità di mediare l'uccisione delle cellule effettrici diretta da anticorpi (ADCC). Queste attività in vitro sono osservate sia con il costrutto legante l'antigene nudo, sia con il costrutto legante l'antigene coniugato a maitansina, e a livelli variabili di espressione di HER2 (1+, 2+ e 3+).

Esempi nella presente mostrano che il formato (scFv/scFv, scFv/Fab o Fab/Fab) dei costrutti leganti l'antigene è importante nel determinare il suo profilo funzionale. In alcune forme di realizzazione, i costrutti di legame di anti-HER2 presentano una capacità aumentata di essere internalizzati dalle cellule tumorali che esprimono HER2 rispetto a un costrutto legante l'antigene di riferimento in cui i costrutti polipeptidici leganti sia ECD2 sia ECD4 sono Fab. Un formato non rivendicato, in cui i polipeptidi leganti sia ECD2 sia ECD4 sono scFv, è internalizzato in ampia misura dalle cellule tumorali che esprimono HER2 a un livello di 1+, 2+ o 3+ rispetto ai costrutti di affinità equivalente che hanno un formato Fab/scFv (come rivendicato), i quali a loro volta sono internalizzati in modo più efficiente rispetto ai costrutti di affinità equivalente che hanno un formato Fab/Fab. Forme di realizzazione che sono prontamente internalizzate sono buoni candidati per coniugati anticorpo-farmaco, che richiedono l'internalizzazione mediante una cellula tumorale per effettuare l'uccisione. Al contrario, in alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene che non sono prontamente internalizzati presentano una potenza aumentata nell'uccisione ADCC delle cellule tumorali che esprimono bassi livelli di HER2 rispetto ai costrutti di affinità equivalente che hanno un formato Fab/Fab. In una forma di realizzazione, un costrutto legante l'antigene avente un formato Fab/scFv (come rivendicato) è più potente nell'uccisione con ADCC delle cellule tumorali che esprimono bassi livelli di HER2 (HER2 0-1+ o 1+) rispetto a un costrutto anti-HER2 avente un formato Fab/Fab, il quale a sua volta è più potente di un costrutto legante l'antigene avente un formato scFv/scFv. La potenza di ADCC aumentata di alcune forme di realizzazione può essere dovuta alla relativa capacità aumentata di rimanere sulla superficie cellulare (anziché causare l'internalizzazione) e, pertanto, di essere più disponibili per l'uccisione effettrice mediata dalle cellule.

HER2

I costrutti leganti l'antigene descritti nella presente hanno costrutti polipeptidici leganti l'antigene che si legano a ECD2 e ECD4 di HER2

Le espressioni "ErbB2" e "HER2" sono usate in modo intercambiabile nella presente e si riferiscono alla proteina HER2 umana descritta, per esempio, in Semba et al., *PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985) e Yamamoto et al. *Nature* 319:230-234 (1986) (Accesso a Genebank n. X03363). Il termine "erbb2" e "neu" si riferisce al gene che codifica la proteina ErbB2 umana, p185 o p185neu si riferisce al prodotto proteico del gene neu.

HER2 è un recettore di HER. Un "recettore di HER" è una proteina recettore della tirosina chinasi che appartiene alla famiglia dei recettori del fattore di crescita epidermico umano (HER) e include i recettori EGFR, HER2, HER3 e HER4. Un recettore di HER comprenderà in generale un dominio extracellulare, che può legarsi a un ligando HER; un dominio transmembrana lipofilo; un dominio tirosin chinasi intracellulare

conservato; e un dominio di segnalazione carbossi-terminale che ospita svariati residui di tirosina che possono essere fosforilati. Per "ligando HER" si intende un polipeptide che si lega a e/o attiva un recettore HER.

Il dominio extracellulare (ecto) di HER2 comprende quattro domini, Dominio I (ECD1, residui amminoacidici da circa 1-195), Dominio II (ECD2, residui amminoacidici da circa 196-319), Dominio III (ECD3, residui amminoacidici da circa 320-488) e Dominio IV (ECD4, residui amminoacidici da circa 489-630) (numerazione dei residui senza peptide segnale). Si veda Garrett et al. *Mol. Cell.* 11: 495-505 (2003), Cho et al. *Nature* 421: 756-760 (2003), Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004), Tse et al. *Cancer Treat Rev.* 2012 Apr;38(2): 133-42 (2012) o Plowman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750 (1993).

La sequenza di HER2 è la seguente; i confini di ECD sono Dominio I: 1-165; Dominio II: 166-322; Dominio III: 323-488; Dominio IV:

489-607.

```
1 tqvctgtdmk lrlpaspeth ldmlrhlyqg cqvvqgnlel tylptnasls flqdiqevqg
61 yvliahnqvr qvplqrlriv rgtqlfedny alavldngdp lnnttpvtga spggrelql
121 rslteilkqg vliqrnpqlc yqdtilkwki fhknnqlalt lidtnrsrac hpcspmckgs
181 rcwgessedc qsltrtvacg gcarckgplp tdccheqcaa gctgpkhsdc laclhfnhsg
241 icelhcpalv tyntdtfesm pnpegrytfg ascvtacpyn ylstdvgsct lvcplhnqev
301 taedgtqrce kcskpcarvc yglgmehlre vravtsaniq efagckkifg slaflpesfd
361 gdpasntapl qpeqlqvfet leeitgylyi sawpdsldl svfqnlqvir grilhngays
421 ltlqglgisw lglrslrelg sglalihhnt hlcfvhtvpw dqlfrnphqa llhtanrped
481 ecvgeglach qlcarghcgw pgptqcvncs qflrgqecve ecrvlqglpr eyvnarhclp
541 chpecqpqng svtcfgpead qcvacahykd pffcvarcps gvkpdlssymp iwkwfpdeega
601 cqpcpin (SEQ ID NO:xxx)
```

"L'epitopo 2C4" è la regione nel dominio extracellulare di HER2 a cui si lega l'anticorpo 2C4. L'epitopo 2C4 comprende residui del dominio II nel dominio extracellulare di HER2. 2C4 e Pertuzumab si legano al dominio extracellulare di HER2 nella giunzione dei domini I, II e III. Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004). Al fine di vagliare gli anticorpi che si legano all'epitopo 2C4, può essere eseguito un saggio di blocco incrociato di routine come quello descritto in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988). In alternativa, la mappatura dell'epitopo può essere eseguita per valutare se l'anticorpo si lega all'epitopo 2C4 di HER2 usando metodi noti nella tecnica e/o è possibile studiare la struttura anticorpo-HER2 (Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)) per osservare quale/i dominio/i di HER2 è/sono legato/i mediante l'anticorpo.

"L'epitopo 4D5" è la regione nel dominio extracellulare di HER2 a cui si legano l'anticorpo 4D5 (ATCC CRL 10463) e Trastuzumab.

Questo epitopo è vicino al dominio transmembrana di HER2 e all'interno del Dominio IV di HER2. Per vagliare gli anticorpi che si legano all'epitopo 4D5, può essere eseguito un saggio di bloccaggio incrociato di routine come quello descritto in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988). In alternativa, la mappatura dell'epitopo può essere eseguita per valutare se l'anticorpo si lega all'epitopo 4D5 di HER2 (per esempio, qualsiasi uno o più residui nella regione da circa il residuo 529 a circa il residuo 625 inclusi, si veda la Figura 1 della pubblicazione di brevetto statunitense n. 2006/0018899).

"Si lega specificamente a", "legame specifico" o "legame selettivo" indica che il legame è selettivo per l'antigene e può essere discriminato da interazioni indesiderate o non specifiche. La capacità di un costrutto legante l'antigene di legarsi a un determinante antigenico specifico può essere misurata attraverso un saggio immunoassorbente legato a un enzima (ELISA) o altre tecniche familiari a una persona esperta nella tecnica, per esempio la tecnica di risonanza plasmonica di superficie (SPR) (analizzata su uno strumento BIAcore) (Liljeblad et al, *Glyco J* 17, 323-329 (2000)), e saggi di legame tradizionali (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)). In una forma di realizzazione, l'estensione del legame di una frazione legante l'antigene a una proteina non correlata è inferiore a circa il 10% del legame del costrutto legante l'antigene all'antigene come misurato, per esempio, mediante SPR. In alcune forme di realizzazione, un costrutto legante l'antigene che si lega all'antigene, o una molecola legante l'antigene comprendente quella frazione legante l'antigene, ha una costante di dissociazione (K_D) di $< 1 \mu\text{M}$, $< 100 \text{ nM}$, $< 10 \text{ nM}$, $< 1 \text{ nM}$, $< 0,1 \text{ nM}$, $< 0,01 \text{ nM}$ o $< 0,001 \text{ nM}$ (per esempio 10^{-8} M o meno, per esempio da 10^{-8} M a 10^{-13} M , per esempio, da 10^{-9} M a 10^{-13} M).

"Eregulina" (HRG), quando usato nella presente, si riferisce a un polipeptide codificato dal prodotto del gene eregulina come divulgato nel brevetto statunitense n° 5,641,869 o in Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318 (1993). Esempi di eregulina includono eregulina- α , eregulina- β 1, eregulina- β 2 ed eregulina- β 3 (Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992); e brevetto statunitense n° 5,641,869); fattore di differenziazione neurale (NDF) (Peles et al. *Cell* 69: 205-216 (1992)); attività indotta da recettore di acetilcolina (ARIA) (Falls et al. *Cell* 72:801-815 (1993)); fattori di crescita gliale (GGF) (Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318 (1993)); fattore ricavato da neuroni sensoriali e motori (SMDF) (Ho et al. *J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995)); γ -eregulina (Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)). Il termine include frammenti biologicamente attivi e/o varianti di sequenza amminoacidica di un polipeptide HRG di sequenza nativa, come un relativo frammento di dominio simile a EGF (per esempio HRG β 177-244).

"Attivazione di HER" o "attivazione di HER2" si riferisce all'attivazione, o fosforilazione, di qualsiasi uno o più recettori di HER o recettori di HER2. In generale, l'attivazione di HER ha come risultato una trasduzione del segnale (per esempio quella indotta da un dominio chinasi intracellulare di un recettore di HER che fosforila residui di tirosina nel recettore di HER o in un polipeptide substrato). L'attivazione di HER può

essere mediata dal ligando HER che si lega a un dimero HER comprendente il recettore HER di interesse. Il legame del ligando HER a un dimero HER può attivare un dominio chinasi di uno o più recettori HER nel dimero e, di conseguenza, avere come risultato la fosforilazione di residui di tirosina in uno o più recettori HER e/o la fosforilazione di residui di tirosina in uno o più polipeptidi substrato aggiuntivi, come chinasi intracellulari Akt o MAPK.

Costrutti polipeptidici leganti l'antigene derivati

I costrutti polipeptidici leganti l'antigene che formano il costrutto legante l'antigene dell'invenzione sono come definiti nelle rivendicazioni.

Più in generale, i costrutti polipeptidici leganti l'antigene descritti nella presente possono derivare da anticorpi anti-HER2 noti o domini di legame anti-HER2 indipendentemente dal tipo di dominio. Esempi di tipi di domini includono frammenti Fab, scFv e sdAb. Inoltre, se le frazioni leganti l'antigene di un anticorpo anti-HER2 noto o dominio di legame è un Fab, il Fab può essere convertito in un scFv. Allo stesso modo, se la frazione legante l'antigene di un anticorpo anti-HER2 noto o dominio di legame è un scFv, scFv può essere convertito in un Fab. Metodi di conversione tra tipi di domini leganti l'antigene sono noti nella tecnica (si vedano per esempio i metodi per convertire uno scFv in un formato Fab descritti, per esempio, in Zhou et al (2012) Mol Cancer Ther 11:1167-1476).

I costrutti leganti l'antigene descritti nella presente possono derivare da anticorpi anti-HER2 noti che si legano a ECD2 o ECD4. Come descritto altrove nella presente, anticorpi che si legano a ECD2 o ECD4 sono noti nella tecnica e includono, per esempio, 2C4 o pertuzumab (che si legano a ECD2), 4D5 o trastuzumab (che si legano a ECD4). Altri anticorpi che si legano a ECD2 o ECD4 di HER2 sono anche stati descritti nella tecnica, per esempio in WO 2011/147982 (Genmab A/S).

Il costrutto polipeptidico legante l'antigene del costrutto legante l'antigene descritto può derivare da un anticorpo che blocca per il 50% o più il legame dell'anticorpo 4D5 o trastuzumab a ECD4 di HER2. In alcune forme di realizzazione, il costrutto polipeptidico legante l'antigene del costrutto legante l'antigene è ricavato da un anticorpo che blocca per il 50% o più il legame dell'anticorpo 2C4 o pertuzumab a ECD2 di HER2.

Il costrutto polipeptidico legante l'antigene può essere ricavato da un frammento Fab di trastuzumab o pertuzumab. Il polipeptide legante l'antigene può essere ricavato da un scFv.

Il polipeptide legante l'antigene può essere ricavato da versioni umanizzate o chimeriche di questi anticorpi.

Le forme "umanizzate" di anticorpi non umani (per esempio, di roditori) sono anticorpi chimerici che contengono una sequenza minima ricavata da immunoglobulina non umana. Per la maggior parte, gli anticorpi umanizzati sono immunoglobuline umane (anticorpo ricevente) in cui i

residui di una regione ipervariabile del ricevente sono sostituiti da residui di una regione ipervariabile di una specie non umana (anticorpo donatore) come topo, ratto, coniglio o primate non umano avente specificità, affinità e capacità desiderate. In alcuni casi, i residui della regione framework (FR) dell'immunoglobulina umana sono sostituiti da residui non umani corrispondenti. Inoltre, gli anticorpi umanizzati possono comprendere residui che non si trovano nell'anticorpo ricevente o nell'anticorpo donatore. Queste modifiche sono effettuate per perfezionare ulteriormente le prestazioni dell'anticorpo. In generale, l'anticorpo umanizzato comprenderà sostanzialmente tutti gli almeno uno, e tipicamente due, domini variabili, in cui tutte o sostanzialmente tutte le anse ipervariabili corrispondono a quelle di un'immunoglobulina non umana e tutte o sostanzialmente tutte le FR sono quelle di una sequenza di immunoglobulina umana. L'anticorpo umanizzato facoltativamente comprenderà anche almeno una porzione di una regione costante di immunoglobulina (Fc), tipicamente quella di un'immunoglobulina umana. Per ulteriori dettagli, si veda Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Anticorpi HER2 umanizzati includono huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 e huMAb4D5-8 o Trastuzumab (HERCEPTIN®) come descritto nella Tabella 3 del brevetto statunitense n° 5,821,337; 520C9 umanizzato (WO93/21319) e anticorpi 2C4 umanizzati 20' come descritto nella pubblicazione di brevetto statunitense n° 2006/0018899.

Maturazione per affinità

I costrutti leganti l'antigene possono derivare da anticorpi leganti HER2 noti usando la maturazione per affinità.

In casi in cui è auspicabile aumentare l'affinità del polipeptide legante l'antigene per il suo antigene affine, metodi noti nella tecnica possono essere usati per aumentare l'affinità del polipeptide legante l'antigene per il suo antigene. Esempi di tali metodi sono descritti nei seguenti riferimenti, Birtalan *et al.* (2008) *JMB* 377, 1518-1528; Gerstner *et al.* (2002) *JMB* 321, 851-862; Kelley *et al.* (1993) *Biochem* 32(27), 6828-6835; Li *et al.* (2010) *JBC* 285(6), 3865-3871 e Vajdos *et al.* (2002) *JMB* 320, 415-428.

Un metodo esemplificativo per la maturazione per affinità dei domini leganti l'antigene HER2 è descritto come segue. Le strutture del complesso trastuzumab/HER2 (codice PDB 1N8Z) e del complesso pertuzumab/HER2 (codice PDB 1S78) sono usate per la modellizzazione. Le dinamiche molecolari (MD) possono essere impiegate per valutare la natura dinamica intrinseca del complesso WT in un ambiente acquoso. Metodi del campo medio e di eliminazione a fondo cieco, insieme a strutture portanti flessibili, possono essere usati per ottimizzare e preparare strutture modello per i mutanti da sottoporre a screening. Dopo l'impaccamento, sarà valutato un certo numero di caratteristiche, incluse densità di contatto, clash score, idrofobicità ed elettrostatica. Il metodo Generalized Born consentirà una modellizzazione precisa dell'effetto dell'ambiente solvente e calcolerà le differenze di energia libera a seguito della mutazione di posizioni specifiche nella proteina in tipi alternativi di residuo. La densità di

contatto e il clash score forniranno una misura della complementarità, un aspetto critico dell'impaccamento di proteine efficace. La procedura di screening impiega potenziali basati sulla conoscenza nonché schemi di analisi di accoppiamento che si basano su calcoli di energia di interazione residua a coppie ed entropia. Le mutazioni nella letteratura note per aumentare il legame a HER2 e le relative combinazioni sono riepilogate nelle tabelle seguenti:

Tabella A4. Mutazioni di Trastuzumab note per aumentare il legame a HER2 per il sistema Trastuzumab-HER2.

Mutazione	Miglioramento riportato
H_D102W (H_D98W)	3.2X
H_D102Y	3.1X
H_D102K	2.3X
H_D102T	2.2X
H_N55K	2.0X
H_N55T	1.9X
L_H91F	2.1X
L_D28R	1.9X

Tabella A5. Mutazioni di Pertuzumab note per aumentare il legame a HER2 per il sistema Pertuzumab-HER2.

Mutazione	Miglioramento riportato
L_I31A	1.9X
L_Y96A	2.1X
L_Y96F	2.5X
H_T30A	2.1X
H_G56A	8.3X
H_F63V	1.9X

Fc di costrutti leganti l'antigene.

I costrutti leganti l'antigene dell'invenzione comprendono un Fc eterodimerico.

Il termine "dominio Fc" o "regione Fc" nella presente è usato per definire una regione C-terminale di una catena pesante di immunoglobulina che contiene almeno una porzione della regione costante. Il termine include regioni Fc di sequenza nativa e regioni Fc variabili. A meno che non sia specificato in altro modo nella presente, la numerazione dei residui amminoacidici nella regione Fc o nella regione costante avviene secondo il sistema di numerazione EU, anche denominato indice EU, come descritto in Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5° Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Un "polipeptide Fc" di un Fc dimerico come usato nella presente si riferisce a uno dei due polipeptidi formanti il dominio Fc dimerico, vale a dire un polipeptide comprendente regioni costanti C-terminali di una catena pesante di immunoglobulina, in grado di auto-associarsi stabilmente. Per esempio, un polipeptide Fc di un Fc dimerico dell'IgG comprende una sequenza del dominio costante CH2 dell'IgG e CH3 dell'IgG.

Un dominio Fc comprende un dominio CH3 o un dominio CH3 e un dominio CH2. Il dominio CH3 comprende due sequenze CH3, una da ciascuno dei due polipeptidi Fc del Fc dimerico. Il dominio CH2 comprende due sequenze CH2, una da ciascuno dei due polipeptidi Fc del Fc dimerico.

L'Fc secondo l'invenzione comprende due sequenze CH3. Come definito nella rivendicazione 1, l'Fc è accoppiato, con linker, a un primo costruito legante l'antigene e a un secondo costruito legante l'antigene. In alcuni aspetti, l'Fc è un Fc umano. In alcuni aspetti, l'Fc è un Fc dell'IgG o IgG1 umana. L'Fc comprende due sequenze CH2.

In alcuni aspetti, l'Fc comprende una o più modifiche in almeno una delle sequenze CH3. In alcuni aspetti, l'Fc comprende una o più modifiche in almeno una delle sequenze CH2. In alcuni aspetti, un Fc è un singolo polipeptide. In alcuni aspetti, un Fc sono più peptidi, per esempio, due polipeptidi.

In alcuni aspetti, un Fc è un Fc descritto nelle domande di brevetto PCT/CA2011/001238 (pubblicata come WO 2012/058768), depositata il 4 novembre 2011 o PCT/CA2012/050780 (pubblicata come WO 2013/063702), depositata il 2 novembre 2012.

Domini CH3 modificati

In alcuni aspetti, il costruito legante l'antigene descritto nella presente comprende un Fc eterodimerico comprendente un dominio CH3 modificato che è stato modificato asimmetricamente. L'Fc eterodimerico può comprendere due polipeptidi del dominio costante di catena pesante: un primo polipeptide Fc e un secondo polipeptide Fc, che possono essere usati in modo intercambiabile, a condizione che l'Fc comprenda un primo polipeptide Fc e un secondo polipeptide Fc. In generale, il primo polipeptide Fc comprende una prima sequenza CH3 e il secondo polipeptide Fc comprende una seconda sequenza CH3.

In generale, due sequenze CH3 che comprendono una o più modifiche amminoacidiche introdotte in modo asimmetrico hanno come risultato un Fc eterodimerico (come rivendicato), piuttosto che un omodimero, quando le due sequenze CH3 dimerizzano. Come usato nella presente, "modifiche amminoacidiche asimmetriche" si riferisce a qualsiasi modifica in cui un amminoacido in una specifica posizione su una prima sequenza CH3 è differente dall'amminoacido su una seconda sequenza CH3 nella stessa posizione, e la prima e la seconda sequenza CH3 si accoppiano in via preferenziale per formare un eterodimero piuttosto che un omodimero. Questa eterodimerizzazione può avere come risultato la modifica soltanto di uno dei due amminoacidi nella stessa rispettiva posizione amminoacidica su ciascuna sequenza; o la modifica di entrambi gli amminoacidi su ciascuna sequenza nella stessa rispettiva posizione su ciascuna tra la prima e la seconda sequenza CH3. La prima e la seconda sequenza CH3 di un Fc eterodimerico può comprendere una o più di una modifica amminoacidica asimmetrica.

La Tabella A fornisce la sequenza amminoacidica della sequenza Fc di IgG1 umana, corrispondente agli amminoacidi da 231 a 447 della catena pesante completa dell'IgG1 umana. La sequenza CH3 comprende gli amminoacidi 341-447 della catena pesante completa dell'IgG1 umana.

Tipicamente, un Fc può includere due sequenze di catena pesante contigue (A e B) che sono in grado di dimerizzare. In alcuni aspetti, una o entrambe le sequenze di un Fc includono una o più mutazioni o modifiche nelle seguenti posizioni: L351, F405, Y407, T366, K392, T394, T350, S400 e/o N390 usando la numerazione EU. In alcuni aspetti, un Fc include una sequenza mutante mostrata nella Tabella X. In alcuni aspetti, un Fc include le mutazioni della Variante 1 A-B. In alcuni aspetti, un Fc include le mutazioni della Variante 2 A-B. In alcuni aspetti, un Fc include le mutazioni della Variante 3 A-B. In alcuni aspetti, un Fc include le mutazioni della Variante 4 A-B. In alcuni aspetti, un Fc include le mutazioni della Variante 5 A-B.

Tabella A: sequenze Fc di IgG1

Sequenza Fc di IgG1 umana 231-447 (numerazione EU)	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: xxx)</p>	
Variante di sequenza Fc di IgG1 (231-447)	Catena	Mutazioni
1	A	L351Y_F405A_Y407V
1	B	T366L_K392M_T394W
2	A	L351Y_F405A_Y407V
2	B	T366L_K392L_T394W
3	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
3	B	T350V_T366L_K392L_T394W
4	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
4	B	T350V_T366L_K392M_T394W
5	A	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V
5	B	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W

La prima e la seconda sequenza CH3 possono comprendere mutazioni amminoacidiche come descritto nella presente, facendo riferimento agli amminoacidi da 231 a 447 della catena pesante dell'IgG1 umana a lunghezza completa. In una forma di realizzazione, l'Fc eterodimerico comprende un dominio CH3 modificato con una prima sequenza CH3, avente modifiche amminoacidiche nelle posizioni F405 e Y407, e una seconda sequenza CH3, avente modifiche amminoacidiche nella posizione T394. In una forma di realizzazione, l'Fc eterodimerico comprende un dominio CH3 modificato con una prima sequenza CH3, avente una o più modifiche amminoacidiche selezionate tra L351Y, F405A e Y407V, e la seconda

sequenza CH3, avente una o più modifiche amminoacidiche selezionate tra T366L, T366I, K392L, K392M e T394W.

In una forma di realizzazione, un Fc eterodimerico comprende un dominio CH3 modificato con una prima sequenza CH3, avente modifiche amminoacidiche nelle posizioni L351, F405 e Y407, e una seconda sequenza CH3, avente modifiche amminoacidiche nelle posizioni T366, K392 e T394, e una delle prime o seconde sequenze CH3 comprendente inoltre modifiche amminoacidiche nella posizione Q347 e l'altra sequenza CH3 comprendente inoltre una modifica di amminoacido nella posizione K360. In un'altra forma di realizzazione, un Fc eterodimerico comprende un dominio CH3 modificato con una prima sequenza CH3 avente modifiche amminoacidiche nelle posizioni L351, F405 e Y407, e una seconda sequenza CH3 avente modifiche amminoacidiche nelle posizioni T366, K392 e T394, una delle prime o seconde sequenze CH3 comprendendo inoltre modifiche amminoacidiche nella posizione Q347 e l'altra sequenza CH3 comprendendo inoltre una modifica amminoacidica nella posizione K360, e una o entrambe dette sequenze CH3 comprendono inoltre la modifica amminoacidica T350V.

In una forma di realizzazione, un Fc eterodimerico comprende un dominio CH3 modificato con una prima sequenza CH3, avente modifiche amminoacidiche nelle posizioni L351, F405 e Y407, e una seconda sequenza CH3, avente modifiche amminoacidiche nelle posizioni T366, K392 e T394 e una di dette prima e seconda sequenza CH3 comprendendo inoltre la modifica di amminoacido D399R o D399K e l'altra sequenza CH3 comprendendo uno o più tra T411E, T411D, K409E, K409D, K392E e K392D. In un'altra forma di realizzazione, un Fc eterodimerico comprende un dominio CH3 modificato con una prima sequenza CH3, avente modifiche amminoacidiche nelle posizioni L351, F405 e Y407, e una seconda sequenza CH3, avente modifiche amminoacidiche nelle posizioni T366, K392 e T394, una di dette prima e seconda sequenza CH3 comprende inoltre la modifica di amminoacido D399R o D399K e l'altra sequenza CH3 comprendendo una o più tra T411E, T411D, K409E, K409D, K392E e K392D, e una o entrambe di dette sequenze CH3 comprendono inoltre la modifica di amminoacido T350V.

In una forma di realizzazione, un Fc eterodimerico comprende un dominio CH3 modificato con una prima sequenza CH3, avente modifiche amminoacidiche nelle posizioni L351, F405 e Y407, e una seconda sequenza CH3, avente modifiche amminoacidiche nelle posizioni T366, K392 e T394, in cui una o entrambe dette sequenze CH3 comprendono inoltre la modifica di amminoacido T350V.

In una forma di realizzazione, un Fc eterodimerico comprende un dominio CH3 modificato comprendente le seguenti modifiche amminoacidiche, in cui "A" rappresenta le modifiche amminoacidiche alla prima sequenza CH3 e "B" rappresenta le modifiche amminoacidiche alla seconda sequenza CH3: **A:L351Y_F405A_Y407V, B:T366L_K392M_T394W,**

A:L351Y_F405A_Y407V, B:T366L_K392L_T394W, A:T350V_L351Y_F405A_Y407V,

B:T350V_T366L_K392L_T394W, A:T350V_L351Y_F405A_Y407V,

B:T350V_T366L_K392M_T394W, A:T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V, e/o

B:T350V_T366L_N390R_K392M_T394W.

Le una o più modifiche asimmetriche degli amminoacidi possono favorire la formazione di un Fc eterodimerico, in cui il dominio CH3 eterodimerico ha una stabilità che è paragonabile a un dominio CH3 omodimerico wild-type. In una forma di realizzazione, le una o più modifiche asimmetriche degli amminoacidi favoriscono la formazione di un dominio Fc eterodimerico, in cui il dominio Fc eterodimerico ha una stabilità che è paragonabile a un dominio Fc omodimerico wild-type. In una forma di realizzazione, le una o più modifiche amminoacidiche asimmetriche favoriscono la formazione di un dominio Fc eterodimerico, in cui il dominio Fc eterodimerico ha una stabilità osservata tramite la temperatura di fusione (T_m) in uno studio di calorimetria a scansione differenziale e in cui la temperatura di fusione è entro 4 °C rispetto a quella osservata per il corrispondente dominio Fc omodimerico wild-type simmetrico. In alcuni aspetti, l'Fc comprende una o più modifiche in almeno una delle sequenze CH₃ che favoriscono la formazione di un Fc eterodimerico con stabilità paragonabile a un Fc omodimerico wild-type.

In una forma di realizzazione, la stabilità del dominio CH3 può essere valutata misurando la temperatura di fusione del dominio CH3, per esempio mediante calorimetria a scansione differenziale (DSC). Pertanto, in un'ulteriore forma di realizzazione, il dominio CH3 ha una temperatura di fusione di circa 68 °C o superiore. In un'altra forma di realizzazione, il dominio CH3 ha una temperatura di fusione di circa 70 °C o superiore. In un'altra forma di realizzazione, il dominio CH3 ha una temperatura di fusione di circa 72 °C o superiore. In un'altra forma di realizzazione, il dominio CH3 ha una temperatura di fusione di circa 73 °C o superiore. In un'altra forma di realizzazione, il dominio CH3 ha una temperatura di fusione di circa 75 °C o superiore. In un'altra forma di realizzazione, il dominio CH3 ha una temperatura di fusione di circa 78 °C o superiore. In alcuni aspetti, le sequenze CH3 dimerizzate hanno una temperatura di fusione (T_m) di circa 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 77,5, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 o 85 °C o superiore.

In alcune forme di realizzazione, un Fc eterodimerico comprendente sequenze CH3 modificate può essere formato con una purezza almeno circa del 75% rispetto a Fc omodimerico nel prodotto espresso. In un'altra forma di realizzazione, l'Fc eterodimerico è formato con una purezza superiore a circa l'80%. In un'altra forma di realizzazione, l'Fc eterodimerico è formato con una purezza superiore a circa l'85%. In un'altra forma di realizzazione, l'Fc eterodimerico è formato con una purezza superiore a circa il 90%. In un'altra forma di realizzazione, l'Fc eterodimerico è formato con una purezza superiore a circa il 95%. In un'altra forma di realizzazione, l'Fc eterodimerico è formato con una purezza superiore a circa il 97%. In alcuni aspetti, l'Fc è un eterodimero formato con una purezza superiore a circa il 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% quando espresso. In alcuni aspetti, l'Fc è un eterodimero formato con una purezza superiore a circa il 75, 76,

77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% quando espresso tramite una singola cellula.

Metodi aggiuntivi per modificare polipeptidi Fc monomerici per favorire la formazione di Fc eterodimerico sono descritti nella pubblicazione di brevetto internazionale n. WO 96/027011 (knobs into holes), in Gunasekaran et al. (Gunasekaran K. et al. (2010) J Biol Chem. 285, 19637-46, electrostatic design to achieve selective heterodimerization), in Davis et al. (Davis, JH. et al. (2010) Prot Eng Des Sel ;23(4): 195-202, strand exchange engineered domain (SEED) technology), and in Labrijn et al [Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. Labrijn AF, Meesters JI, de Goeij BE, van den Bremer ET, Neijssen J, van Kampen MD, Strumane K, Verploegen S, Kundu A, Gramer MJ, van Berkel PH, van de Winkel JG, Schuurman J, Parren PW. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Mar 26;110(13):5145-50.

Domini CH2

L'Fc del costruito legante l'antigene secondo l'invenzione comprende un dominio CH2. Un esempio di un dominio CH2 di un Fc è l'amminoacido 231-340 della sequenza mostrata nella Tabella A. Sviate funzioni dell'effettore sono mediate da recettori Fc (FcR), che si legano all'Fc di un anticorpo.

I termini "recettore Fc" e "FcR" sono usati per descrivere un recettore che si lega alla regione Fc di un anticorpo. Per esempio, un FcR può essere un FcR umano di sequenza nativa. In generale, un FcR è uno che si lega a un anticorpo della IgG (un recettore gamma) e include recettori delle sottoclassi FcγRI, FcγRII e FcγRIII, incluse varianti alleliche e forme alternativamente sdoppiate di questi recettori. I recettori FcγRII includono FcγIIA (un "recettore attivante") e FcγRIIB (un "recettore inibente"), che hanno sequenze amminoacidiche simili che differiscono principalmente nei relativi domini citoplasmatici. Le immunoglobuline di altri isotipi possono anche essere legate mediante determinati FcR (si veda, per esempio, Janeway et al., *Immuno Biology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4° Ed., 1999)). Il recettore attivante FcγRIIA contiene un motivo di attivazione dell'immunorecettore basato su tirosina (ITAM) nel suo dominio citoplasmatico. Il recettore inibente FcγRIIB contiene un motivo di inibizione dell'immunorecettore basato su tirosina (ITIM) nel suo dominio citoplasmatico (riesaminato in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Gli FcR sono riesaminati in Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); e de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Altri FcR, inclusi quelli che dovranno essere identificati in futuro, sono compresi nel termine "FcR" nella presente. Il termine include anche il recettore neonatale, FcRn, che è responsabile del trasferimento delle IgG materne al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976); e Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

Modifiche nel dominio CH2 possono influenzare il legame di FcR a Fc. Un certo numero di modifiche degli amminoacidi nella regione Fc è noto nella tecnica per alterare selettivamente l'affinità di Fc per differenti recettori Fc-gamma. In alcuni aspetti, l'Fc comprende una o più

modifiche per favorire il legame selettivo dei recettori Fc-gamma.

Mutazioni esemplificative che alterano il legame di FcR a Fc sono elencate di seguito:

S298A/E333A/K334A, S298A/E333A/K334A/K326A (Lu Y, Vernes JM, Chiang N, et al. J Immunol Methods. 28 febbraio 2011;365(1-2):132-41);

F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L (Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, et al. Cancer Res. 2007 Sep 15;67(18):8882-90; Nordstrom JL, Gorlatov S, Zhang W, et al. Breast Cancer Res. 2011 Nov 30;13(6):R123);

F243L (Stewart R, Thom G, Levens M, et al. Protein Eng Des Sel. 2011 Sep;24(9):671-8.), S298A/E333A/K334A (Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al. J Biol Chem. 2001 Mar 2;276(9):6591-604);

S239D/I332E/A330L, S239D/I332E (Lazar GA, Dang W, Karki S, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Mar 14;103(11):4005-10);

S239D/S267E, S267E/L328F (Chu SY, Vostiar I, Karki S, et al. Mol Immunol. 2008 Sep;45(15):3926-33);

S239D/D265S/S298A/I332E, S239E/S298A/K326A/A327H, G237F/S298A/A330L/I332E, S239D/I332E/S298A, S239D/K326E/A330L/I332E/S298A, G236A/S239D/D270L/I332E, S239E/S267E/H268D, L234F/S267E/N325L, G237F/V266L/S267D e altre mutazioni elencate in WO2011/120134 e WO2011/120135. *Therapeutic Antibody Engineering* (di William R. Strohl e Lila M. Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 37 9, Ott 2012) elenca mutazioni alla pagina 283.

In alcune forme di realizzazione, un costrutto legante l'antigene descritto nella presente comprende un costrutto polipeptidico legante l'antigene che si lega a un antigene; e un Fc dimerico che ha proprietà biofisiche superiori, come stabilità e facilità di fabbricazione, rispetto a un costrutto legante l'antigene che non include lo stesso Fc dimerico. In alcune forme di realizzazione, un dominio CH2 comprende una o più modifiche amminoacidiche asimmetriche. Mutazioni asimmetriche esemplificative sono descritte nella domanda di brevetto internazionale n. PCT/CA2014/050507 (pubblicata come WO 2014/190441).

Modifiche aggiuntive per migliorare la funzione dell'effettore.

In alcune forme di realizzazione, un costrutto legante l'antigene descritto nella presente include modifiche per migliorare la sua capacità di mediare la funzione dell'effettore. Tali modifiche sono note nella tecnica e includono afucosilazione o ingegnerizzazione dell'affinità di Fc verso un recettore attivante, principalmente FCGR3a per ADCC, e verso C1q per CDC. La seguente Tabella B riassume varie progettazioni riportati in letteratura per l'ingegnerizzazione della funzione dell'effettore.

Pertanto, in una forma di realizzazione, un costrutto descritto nella presente può includere un Fc dimerico che comprende una o più

modifiche amminoacidiche come indicato nella Tabella B che conferiscono una funzione dell'effettore migliorata. In un'altra forma di realizzazione, il costrutto può essere afucosilato per migliorare la funzione dell'effettore.

Tabella B: Domini CH2 e ingegnerizzazione della funzione dell'effettore.

Riferimento	Mutazioni	Effetto
Lu, 2011, Ferrara 2011, Mizushima 2011	Afucosilato	ADCC aumentata
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A	ADCC aumentata
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A/K326A	ADCC aumentata
Stavenhagen, 2007	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	ADCC aumentata
Nordstrom, 2011	F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L	ADCC aumentata
Stewart, 2011	F243L	ADCC aumentata
Shields, 2001	S298A/E333A/K334A	ADCC aumentata
Lazar, 2006	S239D/I332E/A330L	ADCC aumentata
Lazar, 2006	S239D/I332E	ADCC aumentata
Bowles, 2006	AME-D, mutazioni non specificate	ADCC aumentata
Heider, 2011	37.1, mutazioni non divulgate	ADCC aumentata
Moore, 2010	S267E/H268F/S324T	CDC aumentata

Modifiche di Fc che riducono il legame Fc γ R e/o il legame del complemento e/o la funzione dell'effettore sono note nella tecnica. Pubblicazioni recenti descrivono strategie che sono state usate per preparare anticorpi con attività dell'effettore ridotta o silenziata (si veda Strohl, WR (2009), Curr Opin Biotech 20:685-691, e Strohl, WR e Strohl LM, "Antibody Fc engineering for optimal antibody performance" In Therapeutic Antibody Engineering, Cambridge: Woodhead Publishing (2012), pagine 225-249). Queste strategie includono la riduzione della funzione dell'effettore attraverso la modifica della glicosilazione, l'uso di scaffold di IgG2/IgG4 o l'introduzione di mutazioni nella cerniera o nelle regioni CH2 dell'Fc. Per esempio, la pubblicazione di brevetto statunitense n. 2011/0212087 (Strohl), domanda di brevetto internazionale n. WO 2006/105338 (Xencor), pubblicazione di brevetto statunitense n. 2012/0225058 (Xencor), pubblicazione di brevetto statunitense n. 2012/0251531 (Genentech) e Strop et al ((2012) J. Mol. Biol. 420: 204-219) descrivono modifiche specifiche per ridurre il legame di Fc γ R o complemento a Fc.

Esempi specifici non limitativi di modifiche degli amminoacidi note per ridurre il legame di Fc γ R o complemento a Fc includono quelli identificati nella tabella seguente:

Tabella C: modifiche per ridurre il legame di Fc γ R o del complemento all'Fc

Società	Mutazioni
GSK	N297A
Ortho Biotech	L234A/L235A
Protein Design labs	IGG2 V234A/G237A
Wellcome Labs	IGG4 L235A/G237A/E318A
GSK	IGG4 S228P/L236E
Alexion	IGG2/IGG4combo

Merck	IGG2 H268Q/V309L/A330S/A331S
Bristol-Myers	C220S/C226S/C229SIP238S
Seattle Genetics	C226S/C229S/E3233P/L235V/L235A
Amgen	produzione di E.coli, non glico
Medimune	L234F/L235E/P331S
Trubion	Mutante cerniera, eventualmente C226S/P230S

In una forma di realizzazione, l'Fc comprende almeno una modifica amminoacidica identificata nella tabella di cui sopra. In un'altra forma di realizzazione, l'Fc comprende una modifica amminoacidica di almeno uno tra L234, L235 o D265. In un'altra forma di realizzazione, l'Fc comprende una modifica amminoacidica in L234, L235 e D265. In un'altra forma di realizzazione, l'Fc comprende la modifica amminoacidica in L234A, L235A e D265S.

Linker e polipeptidi linker

Ciascuno dei costrutti polipeptidici leganti l'antigene del costrutto legante l'antigene è legato operativamente a un polipeptide linker, in cui i polipeptidi linker sono legati in modo covalente tra loro. La conformazione spaziale del costrutto legante l'antigene comprendente un primo e un secondo costrutto polipeptidico legante l'antigene con i polipeptidi linker è simile alla conformazione spaziale relativa dei paratopi di un frammento F(ab')₂ generato mediante digestione con papaina, sebbene nel contesto dei costrutti bispecifici leganti l'antigene descritti nella presente i due costrutti polipeptidici leganti l'antigene siano nel formato Fab-scFv o scFv-scFv.

Pertanto, i polipeptidi linker sono selezionati in modo tale che mantengano la conformazione spaziale relativa dei paratopi di un frammento F(ab') e siano in grado di formare un legame covalente equivalente al legame disolfuro nella cerniera di nucleo della IgG. I polipeptidi linker comprendono le regioni cerniera delle IgG da IgG1, IgG2 o IgG4. Possono essere usate anche versioni modificate di questi linker esemplificativi. Per esempio, modifiche per migliorare la stabilità della cerniera delle IgG4 sono note nella tecnica (si veda per esempio, Labrijn et al. (2009) Nature Biotechnology 27, 767 - 771).

I polipeptidi linker sono legati operativamente a uno scaffold come descritto in questo caso, che è un Fc eterodimerico. Di conseguenza, l'Fc eterodimerico è accoppiato ai due costrutti polipeptidici leganti l'antigene con linker comprendenti regioni cerniera delle IgG di IgG1, IgG2 o IgG4. In alcuni aspetti, l'Fc è accoppiato alla catena pesante di ciascun polipeptide legante l'antigene mediante un linker.

È anche descritto, ma non rivendicato, che i polipeptidi linker sono legati operativamente a scaffold diversi da un Fc. Un certo numero di domini proteici o molecolari alternativi è noto nella tecnica e può essere usato per formare coppie selettive di due polipeptidi leganti l'antigene differenti. Un esempio è costituito dai domini cerniera di leucina come Fos e Jun che si accoppiano selettivamente insieme [S A Kostelny, M S Cole, e J Y Tso. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. J Immunol 1992 148:1547-53; Bernd J. Wranik, Erin L. Christensen,

Gabriele Schaefer, Janet K. Jackman, Andrew C. Vendel, e Dan Eaton. LUZ-Y, a Novel Platform for the Mammalian Cell Production of Full-length IgG-bispecific Antibodies. *J. Biol. Chem.* 2012 287: 43331-43339]. In alternativa, possono essere impiegate anche altre coppie molecolari di accoppiamento selettivo come la coppia barnase-barstar [Deyev, S. M., Waibel, R., Lebedenko, E. N., Schubiger, A. P., e Plückthun, A. (2003). Design of multivalent complexes using the barnase*barstar module. *Nat Biotechnol* 21, 1486-1492], coppie di filamenti di DNA [Zahida N. Chaudri, Michael Bartlet-Jones, George Panayotou, Thomas Klonisch, Ivan M. Roitt, Torben Lund, Peter J. Delves, Dual specificity antibodies using a double-stranded oligonucleotide bridge, *FEBS Letters*, Volume 450, Pubblicazioni 1-2, 30 aprile 1999, pagine 23-26], coppie di proteine fluorescenti divise [Ulrich Brinkmann, Alexander Haas. Fluorescent antibody fusion protein, its production and use, WO 2011135040 A1].

Costante di dissociazione (K_D) e legame massimo (B_{max})

In alcune forme di realizzazione, un costrutto legante l'antigene è descritto mediante caratteristiche funzionali inclusi, in via non limitativa, una costante di dissociazione e un legame massimo.

L'espressione "costante di dissociazione (K_D)" come usata nella presente è destinata a fare riferimento alla costante di dissociazione all'equilibrio di una particolare interazione ligando-proteina. Come usate nella presente, le interazioni ligando-proteina si riferiscono, in via non limitativa, a interazioni proteina-proteina o interazioni anticorpo-antigene. La K_D misura la propensione di due proteine (per esempio AB) a dissociarsi reversibilmente in componenti più piccoli (A+B) ed è definita come il rapporto tra il tasso di dissociazione, denominato anche "off-rate (k_{off})", e il tasso di associazione, o "on-rate (k_{on})". Pertanto, K_D è uguale a k_{off}/k_{on} ed è espressa come concentrazione molare (M). Ne consegue che, minore è K_D , maggiore è l'affinità del legame. Pertanto, una K_D di 1 mM indica una debole affinità di legame rispetto a una K_D di 1 nM. I valori di K_D per i costrutti leganti l'antigene possono essere determinati usando metodi stabiliti nella tecnica. Un metodo per determinare la K_D di un costrutto legante l'antigene è quello che usa la risonanza plasmonica di superficie (SPR), tipicamente usa un sistema di biosensore come un sistema Biacore®. La calorimetria isoterma di titolazione (ITC) è un altro metodo che può essere usato per la determinazione.

Le caratteristiche di legame di un costrutto legante l'antigene possono essere determinate mediante varie tecniche. Una di queste è la misurazione del legame alle cellule target che esprimono l'antigene mediante citometria a flusso (FACS, separazione cellulare attivata da fluorescenza). Tipicamente, in tale esperimento, le cellule target che esprimono l'antigene di interesse sono incubate con costrutti leganti l'antigene a concentrazioni differenti, lavate, incubate con un agente secondario per il rilevamento del costrutto legante l'antigene, lavate e analizzate nel citometro a flusso per misurare l'intensità fluorescente mediana (MFI), che rappresenta l'intensità del segnale di rilevamento sulle cellule, che a sua volta è correlata al numero di costrutti leganti l'antigene legati alle cellule. In seguito, la concentrazione di costrutto legante l'antigene vs i dati MFI è adattata

in un'equazione di legame di saturazione per ottenere due parametri di legame chiave, B_{max} e K_D apparente.

K_D apparente, o costante di dissociazione all'equilibrio apparente, rappresenta la concentrazione del costrutto legante l'antigene alla quale è osservato il legame cellulare semimassimale. Evidentemente, minore è il valore di K_D, minore è la concentrazione del costrutto legante l'antigene richiesta per ottenere il legame cellulare massimo e, pertanto, maggiore è l'affinità del costrutto legante l'antigene. La K_D apparente dipende dalle condizioni dell'esperimento di legame cellulare, come differenti livelli di recettore espressi sulle cellule e condizioni di incubazione, e pertanto la K_D apparente è generalmente differente dai valori di K_D determinati da esperimenti molecolari senza cellule come SPR e ITC. Tuttavia, vi è in generale un buon accordo tra i differenti metodi.

Il termine "B_{max}", o legame massimale, si riferisce al livello massimo di legame del costrutto legante l'antigene sulle cellule a concentrazioni di saturazione del costrutto legante l'antigene. Questo parametro può essere riportato nell'unità arbitraria MFI per il confronto relativo oppure convertito in un valore assoluto corrispondente al numero di costrutti leganti l'antigene legati alla cellula con l'uso di una curva standard. In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene mostrano un B_{max} che è 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 volte il B_{max} di un costrutto legante l'antigene di riferimento.

Per i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente, la separazione più chiara in B_{max} rispetto a FSA avviene alle concentrazioni di saturazione e in cui B_{max} non può più essere aumentato con FSA. Il rilievo è minore a concentrazioni non saturanti. In una forma di realizzazione, l'aumento di B_{max} e K_D del costrutto legante l'antigene rispetto a un costrutto legante l'antigene di riferimento è indipendente dal livello di espressione dell'antigene target sulla cellula target.

In alcune forme di realizzazione è un costrutto legante l'antigene isolato descritto nella presente, in cui detto costrutto legante l'antigene mostra un aumento di B_{max} (legame massimo) su una cellula target che mostra detto antigene rispetto a un costrutto legante l'antigene di riferimento corrispondente. In alcune forme di realizzazione, detto aumento di B_{max} è almeno circa il 125% del B_{max} del costrutto legante l'antigene di riferimento corrispondente. In alcune forme di realizzazione, l'aumento di B_{max} è almeno circa il 150% del B_{max} del costrutto legante l'antigene di riferimento corrispondente. In alcune forme di realizzazione, l'aumento di B_{max} è almeno circa il 200% del B_{max} del costrutto legante l'antigene di riferimento corrispondente. In alcune forme di realizzazione, l'aumento di B_{max} è superiore a circa il 110% del B_{max} del costrutto legante l'antigene di riferimento corrispondente.

Funzioni dell'effettore aumentate

In una forma di realizzazione, il costrutto bispecifico legante l'antigene descritto nella presente mostra funzioni dell'effettore aumentate

rispetto a ciascun costrutto monospecifico bivalente legante l'antigene corrispondente (vale a dire rispetto a un costrutto monospecifico bivalente legante l'antigene che si lega a ECD2 o a un costrutto monospecifico bivalente legante l'antigene che si lega a ECD4) e/o rispetto a una combinazione dei due costrutti monospecifico bivalente legante l'antigene. Le "funzioni dell'effettore" dell'anticorpo si riferiscono a quelle attività biologiche attribuibili al dominio Fc (un dominio Fc di sequenza nativa o un dominio Fc variante di sequenza amminoacidica) di un anticorpo. Esempi di funzioni dell'effettore dell'anticorpo includono il legame di C1q; citotossicità dipendente dal complemento (CDC); legame del recettore Fc; citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC); fagocitosi cellulare dipendente da anticorpi (ADCP); sottoregolazione di recettori della superficie cellulare (per esempio, ricettore delle cellule B; BCR), eccetera.

ADCC

Pertanto, in una forma di realizzazione, il costrutto bispecifico legante l'antigene in un formato Fab-scFv secondo l'invenzione mostra una potenza maggiore in un saggio di ADCC rispetto a un costrutto legante l'antigene di riferimento di formato che è un formato Fab-Fab in cellule che esprimono HER2 nel livello 1+.

In una forma di realizzazione, il costrutto bispecifico legante l'antigene mostra una lisi cellulare massima maggiore in un saggio di ADCC rispetto a un costrutto legante l'antigene di riferimento che è trastuzumab o un suo analogo. In una forma di realizzazione, il costrutto bispecifico legante l'antigene in un formato Fab-scFv secondo l'invenzione mostra una lisi cellulare massima maggiore in un saggio di ADCC rispetto a un costrutto legante l'antigene di riferimento che è trastuzumab o un suo analogo, o una combinazione di analoghi di trastuzumab o pertuzumab. In una forma di realizzazione, il costrutto bispecifico legante l'antigene in un formato Fab-scFv secondo l'invenzione mostra una lisi cellulare massima maggiore in un saggio di ADCC rispetto a un costrutto legante l'antigene di riferimento che è trastuzumab o un suo analogo in cellule che esprimono HER2 nel livello 1+ o superiore. In una forma di realizzazione, il costrutto bispecifico legante l'antigene in un formato Fab-scFv secondo l'invenzione mostra una potenza maggiore in un saggio di ADCC rispetto a un costrutto legante l'antigene di riferimento che è trastuzumab o un suo analogo in cellule HER2 2+/3+.

Internalizzazione

I costrutti bispecifico legante l'antigene descritti nella presente sono internalizzati in cellule HER2+, attraverso il legame al recettore HER2. Pertanto, i costrutti bispecifico legante l'antigene descritti nella presente sono in grado di indurre l'internalizzazione del recettore in cellule HER2+. In una forma di realizzazione, il costrutto bispecifico legante l'antigene in un formato Fab-scFv secondo l'invenzione induce un'internalizzazione di HER2 maggiore rispetto a un formato di costrutto legante l'antigene di riferimento che è in un formato Fab-Fab in cellule che

esprimono HER2 al livello 3+. In una forma di realizzazione, il costruito bispecifico legante l'antigene in un formato Fab-scFv secondo l'invenzione induce un'internalizzazione di HER2 maggiore rispetto a un formato di costruito legante l'antigene di riferimento che è in formato Fab-Fab in cellule che esprimono HER2 al livello 2+ o 3+. È inoltre descritto un costruito bispecifico legante l'antigene in un formato scFv-scFv (non rivendicato) che induce un'internalizzazione di HER2 maggiore rispetto a un formato di costruito legante l'antigene di riferimento che è in un formato Fab-Fab in cellule che esprimono HER2 al livello 1+, 2+ o 3+.

Citotossicità cellulare

Il costruito bispecifico legante l'antigene può essere preparato come ADC, come descritto altrove nella presente, e sono citotossici per le cellule. In una forma di realizzazione, l'ADC di costruito bispecifico legante l'antigene mostra una potenza maggiore in un saggio di citotossicità o sopravvivenza cellulare in cellule di cancro mammario HER2+ rispetto a un costruito legante l'antigene di riferimento che è trastuzumab o suo analogo, o un costruito legante l'antigene di riferimento che è una combinazione di T-DM1 e pertuzumab in cellule HER2 1+, 2+, 2+/3+ o 3+.

Capacità di legame aumentata a FcγR

In alcune forme di realizzazione, i costrutti bispecifici leganti l'antigene presentano una capacità di legame maggiore (R_{max}) a uno o più FcγR. In una forma di realizzazione, il costruito bispecifico legante l'antigene presenta un aumento di R_{max} a uno o più FcγR rispetto a un costruito legante l'antigene di riferimento che è v506 o v6246, avente un Fc omodimerico, da circa 1,3 a 2 volte. In una forma di realizzazione, il costruito bispecifico legante l'antigene presenta un aumento di R_{max} a un CD16 FcγR da circa 1,3 a 1,8 volte rispetto al costruito legante l'antigene bivalente di riferimento. In una forma di realizzazione, il costruito bispecifico legante l'antigene presenta un aumento di R_{max} a un CD32 FcγR da circa 1,3 a 1,8 volte rispetto al costruito legante l'antigene bivalente di riferimento. In una forma di realizzazione, il costruito bispecifico legante l'antigene presenta un aumento di R_{max} a un CD64 FcγR da circa 1,3 a 1,8 volte rispetto al costruito legante l'antigene bivalente di riferimento.

Affinità aumentata per FcγR

I costrutti bispecifici leganti l'antigene forniti nella presente hanno un'affinità aumentata per FcγR rispetto ai costrutti bivalenti leganti l'antigene corrispondenti. La concentrazione aumentata di Fc risultante dalla decorazione è coerente con l'attività aumentata di ADCC, ADCP, CDC.

In alcune forme di realizzazione, i costrutti bispecifico legante l'antigene presentano un'affinità aumentata per uno o più FcγR. In una forma di realizzazione, in cui il costruito bispecifico legante l'antigene comprende un polipeptide legante l'antigene che si lega a HER2, i costrutti bispecifico legante l'antigene presentano un'affinità aumentata per almeno un FcγR. In conformità con questa forma di realizzazione, il costruito bispecifico legante l'antigene presenta un'affinità aumentata per CD32.

Legame di FcRn e parametri PK

In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente sono in grado di legarsi a FcRn. Come è noto nella tecnica, il legame a FcRn ricicla l'anticorpo endocitosato dall'endosoma al flusso sanguigno (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766). Questo processo, in combinazione con l'esclusione della filtrazione renale per via delle dimensioni considerevoli della molecola a lunghezza intera, ha come risultato emivite sieriche di anticorpo favorevoli da una a tre settimane. Il legame di Fc a FcRn svolge anche un ruolo chiave nel trasporto dell'anticorpo.

Parametri farmacocinetici

In alcune forme di realizzazione, un costrutto bispecifico legante l'antigene fornito nella presente presenta proprietà farmacocinetiche (PK) comparabili con anticorpi terapeutici disponibili in commercio. In una forma di realizzazione, i costrutti bispecifico legante l'antigene descritti nella presente mostrano proprietà PK simili agli anticorpi terapeutici noti per quanto riguarda concentrazione sierica, t1/2, emivita beta e/o CL. In una forma di realizzazione, i costrutti bispecifico legante l'antigene mostrano stabilità *in vivo* paragonabile o superiore a detto costrutto monospecifico bivalente legante l'antigene. Tali parametri di stabilità *in vivo* includono concentrazione sierica, t1/2, emivita beta, e/o CL.

Test dei costrutti bispecifici leganti l'antigene. Legame di FcγR, FcRn e C1q

Le funzioni dell'effettore dei costrutti bispecifico legante l'antigene possono essere testate come segue. Saggi di citotossicità *in vitro* e/o *in vivo* possono essere eseguiti per valutare le attività di ADCP, CDC e/o ADCC. Per esempio, saggi di legame del recettore Fc (FcR) possono essere eseguiti per misurare il legame di FcγR. Le cellule primarie per mediare ADCC, cellule NK, esprimono soltanto FcγRIII, mentre i monociti esprimono FcγRI, FcγRII e FcγRIII. L'espressione di FcR sulle cellule ematopoietiche è riepilogata nella Tabella 3 alla pagina 464 di Ravetch e Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Un esempio di un saggio *in vitro* per valutare l'attività di ADCC di una molecola di interesse è descritto nel brevetto statunitense n° 5,500,362 o 5,821,337. Cellule effettrici utili per tali saggi includono cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) e cellule natural killer (NK). In alternativa o in aggiunta, l'attività ADCC della molecola di interesse può essere valutata *in vivo*, per esempio, in un modello animale come quello divulgato in Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998). Saggi di legame C1q possono anche essere effettuati per determinare se i costrutti bispecifici leganti l'antigene sono in grado di legare C1q e, pertanto, attivare CDC. Per valutare l'attivazione del complemento, può essere eseguito un saggio CDC, per esempio come descritto in Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). Il legame FcRn, come mediante SPR, e determinazioni PK *in vivo* degli anticorpi possono essere effettuate anche usando metodi ben noti nella tecnica.

Test di costrutti leganti l'antigene: legame HER2

I costrutti leganti l'antigene o le composizioni farmaceutiche descritte nella presente sono testati *in vitro* e in seguito *in vivo* per l'attività terapeutica o profilattica desiderata, prima dell'uso negli esseri umani. Per esempio, i saggi *in vitro* per dimostrare l'utilità terapeutica o profilattica di un composto o di una composizione farmaceutica includono l'effetto di un composto su una linea cellulare o un campione di tessuto del paziente. L'effetto del composto o della composizione sulla linea cellulare e/o sul campione di tessuto può essere determinato usando tecniche note agli esperti nella tecnica, inclusi, in via non limitativa, saggi di formazione di rosette e saggi di lisi cellulare. In conformità con la divulgazione, i saggi *in vitro* che possono essere usati per determinare se è indicata la somministrazione di un costrutto legante l'antigene specifico includono saggi di coltura cellulare *in vitro* o saggi *in vitro* in cui un campione di tessuto del paziente è fatto crescere in coltura ed esposto o somministrato in altro modo al costrutto legante l'antigene, e viene osservato l'effetto di tale costrutto legante l'antigene sul campione di tessuto.

I costrutti leganti l'antigene candidati possono essere saggiati usando cellule, per esempio, linee cellulari di cancro mammario che esprimono HER2. La seguente Tabella D descrive il livello di espressione di HER2 in svariate linee cellulari di cancro rappresentative.

Tabella D - Livelli di espressione relativa di HER2 in linee cellulari di interesse.

Linea cellulare	Descrizione	Punteggio IHC	Recettori HER2/cellula
NCI-N87	carcinoma gastrico umano	3+	Non valutati
A549	Carcinoma alveolare polmonare umano (cancro del polmone non a piccole cellule)	0/1+	Non valutati
BxPC-3	Adenocarcinoma pancreatico umano	1+	Non valutati
MIA PaCa-2	Adenocarcinoma duttale pancreatico umano	2+	Non valutati
FaDu	Carcinoma a cellule squamose faringeo umano	2+	Non valutati
HCT-116	Carcinoma epiteliale coloretale umano	1+	Non valutati
WI-38	Polmone fetale normale	0	1.0×10E4
MDA-MB-231	Adenocarcinoma epiteliale mammario triplo negativo umano	0/1+	1.7×10E4 - 2.3×10E4
MCF-7	Adenocarcinoma epiteliale mammario umano positivo al recettore degli estrogeni	1+	4×10E4 - 7×10E4
JIMT-1	Carcinoma epiteliale mammario resistente a trastuzumab, oncogene amplificato con HER2, insensibile ai farmaci inibitori di HER2 (<i>vale a dire</i> Herceptin™)	2+	2×10E5 - 8×10E5
ZR-75-1	Carcinoma duttale mammario positivo al recettore degli estrogeni	2+	3×10E5
SKOV-3	Adenocarcinoma epiteliale ovarico umano, amplificato con gene HER2	2/3+	5×10E5 - 1×10E6
SK-BR-3	Adenocarcinoma epiteliale mammario umano	3+	> 1×10E6
BT-474	Carcinoma duttale epiteliale mammario umano,	3+	> 1×10E6

McDonagh et al Mol Cancer Ther. 2012 Mar;11(3):582-93; Subik et al. (2010) Breast Cancer: Basic Clinical Research:4; 35-41; Carter et al. PNAS, 1994;89:4285-4289; Yarden 2000, HER2: Basic Research, Prognosis and Therapy; Hendricks et al Mol Cancer Ther 2013; 12: 1816-

28.

Come è noto nella tecnica, può essere impiegato un certo numero di saggi al fine di identificare costrutti leganti l'antigene idonei per l'uso nei metodi descritti nella presente. Questi saggi possono essere eseguiti in cellule cancerose che esprimono HER2. Esempi di cellule cancerose idonee sono identificati nella Tabella A5. Esempi di saggi che possono essere eseguiti sono descritti come segue.

Per esempio, per identificare costrutti candidati leganti l'antigene inibitori della crescita che si legano a HER2, è possibile vagliare anticorpi che inibiscono la crescita di cellule cancerose che esprimono HER2. In una forma di realizzazione, il costrutto candidato legante l'antigene prescelto è in grado di inibire la crescita di cellule cancerose in coltura cellulare di circa il 20-100% e preferibilmente di circa il 50-100% rispetto a un costrutto legante l'antigene di controllo.

Per selezionare costrutti candidati leganti l'antigene che inducono la morte cellulare, la perdita di integrità della membrana come indicato, per esempio, mediante assorbimento di PI (fosfatidilinositolo), può essere valutato trypan blue o 7AAD rispetto a un controllo.

Per selezionare costrutti candidati leganti l'antigene che inducono l'apoptosi, può essere impiegato un saggio di legame di annessina. Oltre al saggio di legame di annessina, può essere usato anche un saggio di colorazione del DNA.

In una forma di realizzazione, il costrutto candidato legante l'antigene di interesse può bloccare l'associazione dipendente da erregulina di ErbB2 con ErbB3 nelle cellule sia MCF7 sia SK-BR-3 come determinato in un esperimento di co-immunoprecipitazione in modo sostanzialmente più efficace rispetto all'anticorpo monoclonale 4D5, e preferibilmente in modo sostanzialmente più efficace rispetto all'anticorpo monoclonale 7F3.

Per vagliare i costrutti leganti l'antigene che si legano a un epitopo su ErbB2 legato da un anticorpo di interesse, può essere eseguito un saggio di blocco incrociato di routine come quello descritto in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988). In alternativa o in aggiunta, la mappatura dell'epitopo può essere eseguita mediante metodi noti nella tecnica.

In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente sono saggiati per la funzione in vivo, per esempio, in modelli animali. In alcune forme di realizzazione, i modelli animali sono quelli descritti nella Tabella E. In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene mostrano un aumento <InsertFunctionHere> in un modello animale rispetto a un costrutto legante l'antigene di controllo.

Tabella E: Modelli animali per testare i costrutti leganti l'antigene di legame a HER2

Modello di xenotrapianto	Descrizione	Riferimento
cancro ovarico umano SKOV3	HER2+/3+, gene amplificato, moderatamente sensibile a trastuzumab	Rhodes et al. 2002. American Journal of Pathology 118:408-417; Sims et al. 2012. British Journal of Cancer 106: 1779-1789
cancro	HER2 3+, negativo al recettore degli estrogeni, negativo al recettore del	Marangoni et al. 2007. Clinical Cancer

mammario metastatico umano HBCx-13b	progesterone; carcinoma mammario duttale invasivo; resistente alla chemioterapia, resistente a Trastuzumab	Research 13:3989-3998; Reyal et al. 2012. Breast Cancer Research 14:R11
cancro mammario umano T226	HER2 3+, negativo al recettore degli estrogeni, negativo al recettore del progesterone; cancro mammario infiammatorio; resistente a Trastuzumab, moderatamente sensibile a Docetaxel e capecitabina, sensibile ad adriamicina/ciclofosfamide	
cancro mammario umano HBCx-5	HER2 3+, negativo al recettore degli estrogeni, negativo al recettore del progesterone; carcinoma duttale invasivo, luminale B; resistente a Trastuzumab, moderatamente sensibile a Docetaxel, capecitabina, sensibile ad adriamicina/ciclofosfamide	Marangoni et al. 2007. Clinical Cancer Research 13:3989-3998; Reyal et al. 2012. Breast Cancer Research 14:R11
cancro mammario umano JIMT-1	HER2 2+, amplificato con gene HER2, resistente a Trastuzumab e pertuzumab	Tanner et al. 2004. Molecular Cancer Therapeutics 3: 1585-1592

Costrutto legante l'antigene di riferimento

In alcune forme di realizzazione, le caratteristiche funzionali dei costrutti bispecifici leganti l'antigene descritti nella presente sono confrontate con quelle di un costrutto legante l'antigene di riferimento. L'identità del costrutto legante l'antigene di riferimento dipende dalla caratteristica funzionale misurata o dalla distinzione effettuata. Per esempio, quando si confrontano le caratteristiche funzionali di costrutti bispecifici leganti l'antigene esemplificativi, il costrutto legante l'antigene di riferimento può essere un analogo di trastuzumab come, per esempio, v506 oppure può essere una combinazione di anticorpi come trastuzumab e pertuzumab (v4184). Nelle forme di realizzazione in cui viene confrontato il formato del costrutto bispecifico legante l'antigene, il costrutto legante l'antigene di riferimento è, per esempio, un anticorpo anti-HER2 biparatopico in cui entrambe le frazioni leganti l'antigene sono nel formato Fab-Fab (costrutto legante l'antigene di riferimento di formato). Esempi di quest'ultimo costrutto includono v6902 e v6903.

Costrutti leganti l'antigene e coniugati farmaco-anticorpo (ADC)

In alcune forme di realizzazione, un costrutto legante l'antigene è coniugato a un farmaco, per esempio una tossina, un agente chemioterapico, un immunomodulatore o un radioisotopo. Diversi metodi di preparazione degli ADC (coniugati farmaco-anticorpo o coniugati farmaco-costrutto di legame dell'antigene) sono noti nella tecnica e sono descritti, per esempio, nei brevetti statunitensi 8,624,003 (metodo in vaso), 8,163,888 (a una fase), e 5,208,020 (metodo a due fasi).

In alcune forme di realizzazione, il farmaco è selezionato tra una maitansina, auristatina, calicheamicina o un suo derivato. In altre forme di realizzazione, il farmaco è una maitansina selezionata tra DM1 e DM4. Ulteriori esempi sono descritti di seguito.

In alcune forme di realizzazione, il farmaco è coniugato al costrutto legante l'antigene isolato con un linker SMCC (DM1) o un linker SPDB (DM4). Esempi aggiuntivi sono descritti di seguito. Il rapporto farmaco-proteina legante l'antigene (DAR) può essere, per esempio, da 1,0 a

6,0 o da 3,0 a 5,0 o 3,5-4,2.

In alcune forme di realizzazione, il costruito legante l'antigene è coniugato a un agente citotossico. L'espressione "agente citotossico", come usato nella presente, si riferisce a una sostanza che inibisce o impedisce la funzione delle cellule e/o induce la distruzione delle cellule. Il termine è destinato ad includere isotopi radioattivi (per esempio, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32 e Lu177), agenti chemioterapici e tossine come tossine a piccole molecole o tossine enzimaticamente attive di origine batterica, fungina, vegetale o animale, inclusi frammenti e/o relative varianti. Ulteriori esempi sono descritti di seguito.

Farmaci

Esempi non limitativi di farmaci o carichi utili usati in varie forme di realizzazione di ADC includono DM1 (maitansina, N²-deacetil-N²-(3-mercapto-1-ossopropil)- o N²-deacetil-N²'-(3-mercapto-1-ossopropil)-maitansina), mc-MMAD (6-maleimmidocaproil-monometilauristatin-D o N-metil-L-valil-N-[(1S,2R)-2-metossi-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metossi-2-metil-3-osso-3-[[[(1S)-2-fenil-1-(2-tiazolil)etil]ammino]propil]-1-pirrolidinil]-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-ossobutil]-N-metil-(9CI)-L-valinammide), mc-MMAF (maleimmidocaproil-monometilauristatina F o N-[6-(2,5-diidro-2,5-diosso-1H-pirrol-1-il)-1-ossoesil]-N-metil-L-valil-L-valil-(3R,4S,5S)-3-metossi-5-metil-4-(metilammino)eptanoil-(αR, (βR,2S)-(3-metossi-α-metil-2-pirrolidinepropanoil-L-fenilalanina) e mc-Val-Cit-PABA-MMAE (6-maleimmidocaproil-ValcCit-(p-amminobenzilossicarbonil)-monometilauristatina E o N-[[[4-[[N-[6-(2,5-diidro-2,5-diosso-1H-pirrol-1-il)-1-ossoesil]-L-valil-N5-(amminocarbonil)-L-ornitil]ammino]fenil]metossi]carbonil]-N-metil-L-valil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1R,2S)-2-idrossi-1-metil-2-feniletil]ammino]-1-metossi-2-metil-3-ossopropil]-1-pirrolidinil] -2-metossi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-ossobutil]-N-metil-L-valinammide). DM1 è un derivato dell'inibitore della tubulina maitansina mentre MMAD, MMAE e MMAF sono derivati dell'auristatina.

Frazioni di farmaci maitansinoidi

Come indicato sopra, in alcune forme di realizzazione il farmaco è un maitansinoide. Esempi di maitansinoidi includono DM1, DM3 (N²-deacetil-N²-(4-mercapto-1-ossopentil) maitansina) e DM4 (N²-deacetil-N²'-(4-metil-4-mercapto-mercapto-1-ossopentil)metilmaitansina) (si veda US20090202536).

Molte posizioni sui composti di maitansina sono note per essere utili come posizione di legame, a seconda del tipo di legame. Per esempio, per formare un legame estere, la posizione C-3 avente un gruppo idrossilico, la posizione C-14 modificata con idrossimetile, la posizione C-15 modificata con un gruppo idrossilico e la posizione C-20 avente un gruppo idrossilico sono tutte idonee.

Tutti gli stereoisomeri della frazione di farmaco maitansinoide sono contemplati per gli ADC descritti nella presente, vale a dire qualsiasi

combinazione di configurazioni R e S nei carboni chirali di D.

Auristatine

In alcune forme di realizzazione, il farmaco è un'auristatina, come auristatina E (anche nota nella tecnica come un derivato di dolastatina-10) o un suo derivato. Per esempio, l'auristatina può essere un estere formato tra auristatina E e un acido cheto. Per esempio, l'auristatina E può essere fatta reagire con acido para-acetilbenzoico o acido benzoilvalerico per produrre rispettivamente AEB e AEVB. Altre auristatine tipiche includono AFP, MMAF e MMAE. La sintesi e la struttura di auristatine esemplificative sono descritte nei brevetti statunitensi n° 6,884,869, 7,098,308, 7,256,257, 7,423,116, 7,498,298 e 7,745,394.

Agenti chemioterapici

In alcune forme di realizzazione, il costruito legante l'antigene è coniugato a un agente chemioterapico. Esempi includono, in via non limitativa, cisplatino e lapatinib. Un "agente chemioterapico" è un composto chimico utile nel trattamento del cancro.

Esempi di agenti chemioterapici includono agenti alchilanti come tiotepa e ciclofosfamide (CYTOXAN™); solfonati alchile come busulfan, improsolfano e piposulfano; aziridine come benzodopa, carboquone, meturedopa e uredopa; etilenimine e metilamelammine inclusi altretamina, trietilenemelamina, trietilenfosforammide, trietilenetiofosforammide e trimetilolomelamina; mostarde azotate come clorambucile, clornafazina, colofosfammide, estramustina, ifosfamide, mecloretamina, mecloretamina ossido cloridrato, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamide, mostarda di uracile; nitrosuree come carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibiotici come aclacinomisine, actinomicina, authramicina, azaserina, bleomicine, cactinomicina, calicheamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicine, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-ossol-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicine, acido micofenolico, nogalamicina, olivomicine, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, streptonigrina, streptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metaboliti come metotrexato e 5-fluorouracile (5-FU); analoghi dell'acido folico come denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; analoghi delle purine come fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; analoghi delle pirimidine come ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideossiridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; androgeni come calusterone, propionato di dromostanolone, epitostanolo, mepitostano, testolattone; anti-adrenali come aminoglutetimide, mitotano, trilostano; ripristinatori dell'acido folico come acido frolinico; aceglatone; glicoside dell'aldosiofosfamide; acido aminolevulinico; amsacrina; bestrabucile; bisantrene; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquone; elfornitina; acetato di elliptinio; etoglucide; nitrato di gallio; idrossiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamolo; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; acido

podofillinico; 2-etilidrazide; procarbazine; PSK7; razossano; sizofiran; spirogermanio; acido tenuazonico; triaziquone; 2, 2',2''-tricloro-trietilammina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitolo; mitolattolo; pipobromano; gacitosina; arabinoside ("Ara-C"); ciclofosfamide; tiotepa; taxani, per esempio paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) e doxetaxel (TAXOTERE[®], Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucile; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; analoghi del platino come cisplatino e carboplatino; vinblastina; platino; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomicina C; mitoxantrone; vincristina; vinorelbina; navelbine; novantrone; teniposide; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibitore della topoisomerasi RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); acido retinoico; esperamicine; capecitabina; e sali, acidi o derivati farmaceuticamente accettabili di qualsiasi di cui sopra. In questa definizione sono inclusi anche agenti anti-ormonali che agiscono per regolare o inibire l'azione degli ormoni sui tumori, come gli anti-estrogeni inclusi, per esempio, tamoxifene, raloxifene, 4(5)-imidazoli inibenti l'aromatasi, 4-idrossitamoxifene, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone e toremifene (Fareston); e anti-androgeni come flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide e goserelina; e sali, acidi o derivati farmaceuticamente accettabili di uno qualsiasi di cui sopra.

Linker coniugati

In alcune realizzazioni, il farmaco è legato al costruito legante l'antigene, per esempio, l'anticorpo, mediante un linker. L'attacco di un linker a un anticorpo può essere realizzato in una varietà di modi, come attraverso lisine di superficie, accoppiamento riduttivo a carboidrati ossidati e attraverso residui di cisteina liberati riducendo i legami disolfuro intercatena. Nella tecnica è nota una varietà di sistemi di legame ADC, inclusi legami a base di idrazone, disolfuro e peptidi.

Linker idonei includono, per esempio, linker clivabili e non clivabili. Tipicamente, un linker clivabile è suscettibile al clivaggio in condizioni intracellulari. Linker clivabili idonei includono, per esempio, un linker peptidico clivabile mediante una proteasi intracellulare, come una proteasi lisosomiale o una proteasi endosomiale. In forme di realizzazione esemplificative, il linker può essere un linker dipeptidico, come un linker valina-citrullina (val-cit), un linker fenilalanina-lisina (phe-lys) o un linker maleimidocapronico-valina-citrullina-p-amminobenzilossicarbonile (mc-Val-Cit-PABA). Un altro linker è sulfosuccinimidil-4-[N-maleimmidometil]cicloesano-1-carbossilato (SMCC). La coniugazione sulfo-smcc avviene tramite un gruppo maleimide che reagisce con i solfidrili (tioli, -SH), mentre il suo estere sulfo-NHS è reattivo verso le ammine primarie (come quelle riscontrate nella lisina e nel terminale N della proteina o del peptide). Un ulteriore linker è maleimmidocaproile (MC). Altri linker idonei includono linker idrolizzabili a un pH specifico o un intervallo di pH, come un linker idrazone. Linker clivabili idonei aggiuntivi includono linker disolfuro. Il linker può essere legato in modo covalente all'anticorpo al punto che l'anticorpo deve essere degradato a livello intracellulare affinché il

farmaco sia rilasciato, per esempio il linker MC e simili.

Preparazione di ADC

L'ADC può essere preparato mediante svariati percorsi, impiegando reazioni di chimica organica, condizioni e reagenti noti agli esperti nella tecnica, inclusi: (1) reazione di un gruppo nucleofilo o un gruppo elettrofilo di un anticorpo con un reagente linker bivalente, per formare l'intermedio anticorpo-linker Ab-L, tramite un legame covalente, seguita da reazione con una frazione di farmaco attivata D; e (2) reazione di un gruppo nucleofilo o un gruppo elettrofilo di una frazione di farmaco con un reagente linker, per formare l'intermedio farmaco-linker D-L, tramite un legame covalente, seguita da reazione con il gruppo nucleofilo o il gruppo elettrofilo di un anticorpo. I metodi di coniugazione (1) e (2) possono essere impiegati con una varietà di anticorpi, frazioni di farmaco e linker per preparare i coniugati anticorpo-farmaco descritti in questo caso.

Diversi esempi specifici di metodi di preparazione degli ADC sono noti nella tecnica e sono descritti nei brevetti statunitensi 8,624,003 (metodo in vaso), 8,163,888 (a una fase) e 5,208,020 (metodo in due fasi).

Metodi di preparazione di costrutti leganti l'antigene

costrutti leganti l'antigene descritti nella presente possono essere prodotti usando metodi e composizioni ricombinanti, per esempio, come descritto nel brevetto statunitense n° 4,816,567.

In una forma di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato che codifica un costrutto legante l'antigene descritto nella presente. Tale acido nucleico può codificare una sequenza amminoacidica comprendente VL e/o una sequenza amminoacidica comprendente VH del costrutto legante l'antigene (per esempio, le catene leggera e/o pesante del costrutto legante l'antigene). In un'ulteriore forma di realizzazione, sono forniti uno o più vettori (per esempio, vettori di espressione) comprendenti tale acido nucleico. In una forma di realizzazione, l'acido nucleico è fornito in un vettore multicistronico. In un'ulteriore forma di realizzazione, viene fornita una cellula ospite comprendente tale acido nucleico. In tale forma di realizzazione, una cellula ospite comprende (per esempio, è stata trasformata con): (1) un vettore comprendente un acido nucleico che codifica una sequenza amminoacidica comprendente il VL del costrutto legante l'antigene e una sequenza amminoacidica comprendente il VH del costrutto polipeptidico legante l'antigene, o (2) un primo vettore comprendente un acido nucleico che codifica una sequenza amminoacidica comprendente il VL del costrutto polipeptidico legante l'antigene e un secondo vettore comprendente un acido nucleico che codifica una sequenza amminoacidica comprendente il VH del costrutto polipeptidico legante l'antigene. In una forma di realizzazione, la cellula ospite è eucariotica, per esempio una cellula di ovaio di criceto cinese (CHO) o una cellula di rene embrionale umano (HEK) o una cellula linfoide (per esempio, cellula Y0, NS0, Sp20). In una forma di realizzazione, è fornito un metodo di realizzazione di un costrutto legante l'antigene, in cui il metodo comprende coltivare una cellula

ospite comprendente acido nucleico che codifica il costrutto legante l'antigene, come fornito sopra, in condizioni idonee per l'espressione del costrutto legante l'antigene e, facoltativamente, recuperare il costrutto legante l'antigene dalla cellula ospite (o dal terreno di coltura della cellula ospite).

Per la produzione ricombinante del costrutto legante l'antigene, per esempio, l'acido nucleico che codifica un costrutto legante l'antigene, come descritto sopra, è isolato e inserito in uno o più vettori per l'ulteriore clonazione e/o espressione in una cellula ospite. Tale acido nucleico può essere prontamente isolato e sequenziato usando procedure convenzionali (per esempio, usando sonde oligonucleotidiche che sono in grado di legarsi nello specifico ai geni che codificano le catene pesanti e leggere del costrutto legante l'antigene).

L'espressione "sostanzialmente purificato" si riferisce a un costrutto descritto nella presente o relativa variante che può essere sostanzialmente o essenzialmente privo/a di componenti che normalmente accompagnano o interagiscono con la proteina riscontrata nel suo ambiente presente in natura, vale a dire una cellula nativa, o cellula ospite nel caso di eteromultimero prodotto in modo ricombinante che, in alcune forme di realizzazione, è sostanzialmente privo di materiale cellulare, include preparazioni di proteina avente circa meno del 30%, circa meno del 25%, circa meno del 20%, circa meno del 15%, circa meno del 10%, circa meno del 5%, circa meno del 4%, circa meno del 3%, circa meno del 2% o circa meno dell'1% (per peso secco) di proteina contaminante. Quando l'eteromultimero o relativa variante è prodotto/a in modo ricombinante dalle cellule ospiti, in alcune forme di realizzazione, la proteina è presente per circa il 30%, circa il 25%, circa il 20%, circa il 15%, circa il 10%, circa il 5%, circa il 4%, circa il 3%, circa il 2% o circa l'1% o meno del peso secco delle cellule. Quando l'eteromultimero o relativa variante è prodotto/a in modo ricombinante dalle cellule ospiti, in alcune forme di realizzazione, la proteina è presente nel terreno di coltura per circa 5 g/l, circa 4 g/l, circa 3 g/l, circa 2 g/l, circa 1 g/l, circa 750 mg/l, circa 500 mg/l, circa 250 mg/l, circa 100 mg/l, circa 50 mg/l, circa 10 mg/l o circa 1 mg/l o meno del peso secco delle cellule. In alcune forme di realizzazione, l'eteromultimero "sostanzialmente purificato", prodotto mediante i metodi descritti nella presente, ha un livello di purezza almeno circa del 30%, almeno circa del 35%, almeno circa del 40%, almeno circa del 45%, almeno circa del 50%, almeno circa del 55%, almeno circa del 60%, almeno circa del 65%, almeno circa del 70%, nello specifico, un livello di purezza almeno circa del 75%, 80%, 85% ,e più in particolare, un livello di purezza almeno circa del 90%, un livello di purezza almeno circa del 95%, un livello di purezza almeno circa del 99% o maggiore come determinato da metodi appropriati come analisi SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC ed elettroforesi capillare.

Cellule ospiti idonee per la clonazione o l'espressione di vettori codificanti costrutti leganti l'antigene includono cellule procariotiche o eucariotiche descritte nella presente.

Una "cellula ospite ricombinante" o "cellula ospite" si riferisce a una cellula che include un polinucleotide esogeno, indipendentemente dal metodo usato per l'inserzione, per esempio, assorbimento diretto, trasduzione, accoppiamento f o altri metodi noti nella tecnica per creare cellule

ospiti ricombinanti. Il polinucleotide esogeno può essere mantenuto come un vettore non integrato, per esempio, un plasmide, o in alternativa può essere integrato nel genoma ospite.

Come usato nella presente, il termine "eucariote" si riferisce a organismi appartenenti al dominio filogenetico Eucarya come animali (inclusi, in via non limitativa, mammiferi, insetti, rettili, uccelli, eccetera), ciliati, piante (inclusi, in via non limitativa, monocotiledoni, dicotiledoni, alghe, eccetera), funghi, lieviti, flagellati, microsporidi, protisti, eccetera.

Come usato nella presente, il termine "procariote" si riferisce a organismi procariotici. Per esempio, un organismo non eucariotico può appartenere al dominio filogenetico Eubacteria (inclusi, in via non limitativa, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, eccetera) o al dominio filogenetico Archaea (inclusi, in via non limitativa, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium* come *Haloferax volcanii* e *Halobacterium* specie NRC-1, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuropyrum pernix*, eccetera).

Per esempio, il costruito legante l'antigene può essere prodotto nei batteri, in particolare quando non sono necessarie glicosilazione e funzione dell'effettore Fc. Per l'espressione di frammenti di costruito legante l'antigene e polipeptidi nei batteri, si vedano, per esempio, i brevetti statunitensi n° 5,648,237, 5,789,199 e 5,840,523. (Si veda anche Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Volume 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pagine 245-254, che descrive l'espressione di frammenti di anticorpo in *E. coli*.) Dopo l'espressione, il costruito legante l'antigene può essere isolato dalla pasta cellulare batterica in una frazione solubile e può essere ulteriormente purificato.

Oltre ai procarioti, i microrganismi eucariotici come i funghi filamentosi o lieviti sono ospiti di clonazione o espressione idonei per vettori che codificano costrutti leganti l'antigene, inclusi ceppi di funghi e lieviti i cui percorsi di glicosilazione sono stati "umanizzati," avendo come risultato la produzione di un costruito legante l'antigene con un pattern di glicosilazione parzialmente o completamente umano. Si vedano Gerngross, *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414 (2004) e Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Cellule ospiti idonee per l'espressione di costrutti leganti l'antigene glicosilati sono anche ricavate da organismi multicellulari (invertebrati e vertebrati). Esempi di cellule di invertebrati includono cellule vegetali e cellule di insetti. Sono stati identificati numerosi ceppi baculovirali che possono essere usati in combinazione con cellule di insetti, in particolare per la trasfezione di cellule di *Spodoptera frugiperda*.

Le colture di cellule vegetali possono anche essere usate come ospiti. Si vedano, per esempio, i brevetti statunitensi n° 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 e 6,417,429 (che descrivono la tecnologia PLANTIBODIES™ per produrre costrutti leganti l'antigene in piante transgeniche).

Le cellule dei vertebrati possono anche essere usate come ospiti. Per esempio, possono essere utili le linee cellulari di mammiferi che sono atte a crescere in sospensione. Altri esempi di linee cellulari ospiti di mammiferi utili sono la linea CV1 renale di scimmia trasformata mediante SV40 (COS-7); la linea renale embrionale umana (293 o cellula 293 come descritto, per esempio, in Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); cellule renali di criceto neonato (BHK); cellule di Sertoli di topo (cellule TM4 come descritto, per esempio, in Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); cellule renali di scimmia (CV1); cellule renali di scimmia verde africana (VERO-76); cellule di carcinoma cervicale umano (HELA); cellule renali canine (MDCK); cellule epatiche di ratto bufalo (BRL 3A); cellule polmonari umane (W138); cellule epatiche umane (Hep G2); tumore mammario murino (MMT 060562); cellule TRI, come descritto, per esempio, in Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); cellule MRC 5; e cellule FS4. Altre linee cellulari ospiti di mammiferi utili includono cellule di ovaio di criceto cinese (CHO), incluse cellule CHO DHFR^r (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); e linee cellulari di mieloma come Y0, NS0 e Sp2/0. Per un riesame di alcune linee cellulari ospiti di mammiferi idonee per la produzione di costrutto legante l'antigene, si veda, per esempio, Yazaki e Wu, *Methods in Molecular Biology*, Volume 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pagine 255-268 (2003).

In una forma di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente sono prodotti in cellule di mammiferi stabili mediante un metodo comprendente: trasfettare almeno una cellula di mammifero stabile con: acido nucleico codificante il costrutto legante l'antigene in un rapporto predeterminato; ed esprimere l'acido nucleico nell'almeno una cellula di mammifero. In alcune forme di realizzazione, il rapporto predeterminato di acido nucleico è determinato in esperimenti di trasfezione temporanea per determinare il rapporto relativo degli acidi nucleici in ingresso, che ha come risultato la percentuale massima del costrutto legante l'antigene nel prodotto espresso.

In alcune forme di realizzazione, è il metodo di produzione di un costrutto legante l'antigene in cellule di mammiferi stabili come descritto nella presente, in cui il prodotto di espressione dell'almeno una cellula di mammifero stabile comprende una percentuale maggiore del costrutto legante l'antigene glicosilato desiderato rispetto ai polipeptidi monomerici di catena pesante o leggera, o altri anticorpi.

In alcune forme di realizzazione, è il metodo di produzione di un costrutto legante l'antigene glicosilato in cellule di mammiferi stabili descritto nella presente, detto metodo comprendendo identificare e purificare il costrutto legante l'antigene glicosilato desiderato. In alcune forme di realizzazione, detta identificazione avviene mediante una tra cromatografia liquida e spettrometria di massa o entrambe.

Se richiesto, i costrutti leganti l'antigene possono essere purificati o isolati dopo l'espressione. Le proteine possono essere isolate o purificate in una varietà di modi noti agli esperti nella tecnica. Metodi di purificazione standard includono tecniche cromatografiche, inclusi scambio ionico, interazione idrofobica, affinità, dimensionamento o filtrazione su gel, e fase inversa, effettuate alla pressione atmosferica o ad alta pressione

usando sistemi come FPLC e HPLC. I metodi di purificazione includono anche tecniche elettroforetiche, immunologiche, di precipitazione, dialisi e cromatofocalizzazione. Sono utili anche le tecniche di ultrafiltrazione e diafiltrazione, in combinazione con la concentrazione delle proteine. Come è noto nella tecnica, una varietà di proteine naturali si lega a Fc e anticorpi e queste proteine possono essere impiegate nella presente divulgazione per la purificazione di costrutti leganti l'antigene. Per esempio, le proteine batteriche A e G si legano alla regione Fc. Allo stesso modo, la proteina batterica L si lega alla regione Fab di alcuni anticorpi. La purificazione può essere consentita spesso mediante un particolare partner di fusione. Per esempio, gli anticorpi possono essere purificati usando resina di glutatione se viene impiegata una fusione GST, cromatografia per affinità Ni²⁺ se viene impiegato un marcatore His o anticorpo anti-flag immobilizzato se viene usato un marcatore flag. Per una guida generale sulle tecniche di purificazione idonee, si veda, per esempio Protein Purification: Principles and Practice, 3^o Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. Il grado di purificazione necessario varierà a seconda dell'uso dei costrutti leganti l'antigene. In alcuni casi, non è necessaria alcuna purificazione.

In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene sono purificati usando la cromatografia a scambio anionico inclusi, in via non limitativa, cromatografia su Q-sepharose, DEAE sepharose, poros HQ, poros DEAF, Toyopearl Q, Toyopearl QAE, Toyopearl DEAE, Resource/Source Q e DEAE, colonne Fractogel Q e DEAE.

In forme di realizzazione specifiche, le proteine descritte nella presente sono purificate usando la cromatografia a scambio cationico, inclusi, in via non limitativa, SP-sepharose, CM sepharose, poros HS, poros CM, Toyopearl SP, Toyopearl CM, Resource/Source S e CM, colonne Fractogel S e CM e i loro equivalenti e comparabili.

In aggiunta, i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente possono essere sintetizzati chimicamente usando tecniche note nella tecnica (per esempio, si veda Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N.Y e Hunkapiller et al., Nature, 310:105-111 (1984)). Per esempio, un polipeptide corrispondente a un frammento di un polipeptide può essere sintetizzato mediante l'uso di un sintetizzatore di peptidi. Inoltre, se desiderato, amminoacidi non classici o analoghi amminoacidici chimici possono essere introdotti come sostituzione o aggiunta nella sequenza polipeptidica. Gli amminoacidi non classici includono, in via non limitativa, gli isomeri D degli amminoacidi comuni, acido 2,4-diamminobutirrico, acido alfa-amminoisobutirrico, acido 4-amminobutirrico, Abu, acido 2-amminobutirrico, g-Abu, e-Ahx, acido 6-amminoesanoico, Aib, acido 2-amminoisobutirrico, acido 3-amminopropionico, ornitina, norleucina, norvalina, idrossiprolina, sarcosina, citrullina, omocitrullina, acido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, cicloesilalanina, α -alanina, amminoacidi fluorurati, amminoacidi di progettazione come α -metil amminoacidi, C α -metil amminoacidi, N α -metil amminoacidi, e analoghi amminoacidici in generale. Inoltre, l'amminoacido può essere D (destrogiro) o L (levogiro).

Modifiche post-traduzionali:

In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente sono modificati in modo differenziale durante o dopo la traduzione.

Il termine "modificato", come usato nella presente, si riferisce a qualsiasi cambiamento apportato a un dato polipeptide, come cambiamenti alla lunghezza del polipeptide, alla sequenza amminoacidica, alla struttura chimica, alla modifica co-traduzionale, o alla modifica post-traduzionale di un polipeptide. L'espressione forma "(modificata)" indica che i polipeptidi in disamina sono facoltativamente modificati, vale a dire che i polipeptidi in disamina possono essere modificati o non modificati.

L'espressione "modificato post-traduzionalmente" si riferisce a qualsiasi modifica di un amminoacido naturale o non naturale che avviene su quell'amminoacido dopo che è stato incorporato in una catena polipeptidica. Il termine comprende, soltanto a titolo esemplificativo, modifiche co-traduzionali in vivo, modifiche co-traduzionali in vitro (come in un sistema di traduzione senza cellule), modifiche post-traduzionali in vivo e modifiche post-traduzionali in vitro.

In alcune forme di realizzazione, la modifica è almeno una tra: glicosilazione, acetilazione, fosforilazione, amidazione, derivatizzazione mediante gruppi protettivi/bloccanti noti, clivaggio proteolitico e legame a una molecola di anticorpo o costrutto legante l'antigene o altro ligando cellulare. In alcune forme di realizzazione, il costrutto legante l'antigene è modificato chimicamente mediante tecniche note, incluse in via non limitativa, clivaggio chimico specifico mediante bromuro di cianogeno, tripsina, chimotripsina, papaina, proteasi V8, NaBH₄; acetilazione, formilazione, ossidazione, riduzione; e sintesi metabolica in presenza di tunicamicina.

Modifiche post-traduzionali aggiuntive di costrutti leganti l'antigene descritte nella presente includono, per esempio, catene di carboidrati legate a N o legate a O, lavorazione di estremità N-terminale o C-terminale, attacco di frazioni chimiche alla struttura amminoacidica, modifiche chimiche di catene di carboidrati legate a N o legate a O e aggiunta o delezione di un residuo di metionina N-terminale come risultato dell'espressione in cellule ospiti procariotiche. I costrutti leganti l'antigene descritti nella presente sono modificati con una marcatura rilevabile, come una marcatura enzimatica, fluorescente, isotopica o di affinità per consentire il rilevamento e l'isolamento della proteina. In alcune forme di realizzazione, esempi di marcature enzimatiche idonee includono perossidasi di rafano, fosfatasi alcalina, beta-galattosidasi o acetilcolinesterasi; esempi di complessi di gruppo prostetico idoneo includono streptavidina biotina e avidina/biotina; esempi di materiali fluorescenti idonei includono umbelliferone, fluoresceina, isotiocianato di fluoresceina, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceina, cloruro di dansile o ficoeritrina; un esempio di materiale luminescente include luminolo; esempi di materiali bioluminescenti includono luciferasi, luciferina e aequorina; ed esempi di materiale radioattivo

idoneo includono iodio, carbonio, zolfo, trizio, indio, tecnezio, tallio, gallio, palladio, molibdeno, xeno, fluoro.

In forme di realizzazione specifiche, i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente sono fissati a chelanti macrociclici che si associano a ioni radiometallici.

In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente sono modificati mediante processi naturali, come lavorazione post-traduzionale, o mediante tecniche di modifica chimica che sono ben note nella tecnica. In alcune forme di realizzazione, lo stesso tipo di modifica può essere presente in grado uguale o variabile in svariati siti in un dato polipeptide. In alcune forme di realizzazione, i polipeptidi dei costrutti leganti l'antigene descritti nella presente sono ramificati, per esempio, come risultato dell'ubiquitinazione e, in alcune forme di realizzazione, sono ciclici, con o senza ramificazione. Polipeptidi ciclici, ramificati e ciclici ramificati sono il risultato di processi naturali post-traduzionali o realizzati mediante metodi sintetici. Le modifiche includono acetilazione, acilazione, ADP-ribosilazione, amidazione, attacco covalente di flavina, attacco covalente di una frazione eme, attacco covalente di un nucleotide o derivato del nucleotide, attacco covalente di un lipide o derivato di lipide, attacco covalente di fosfatidilinositolo, reticolazione, ciclizzazione, formazione di legame disolfuro, demetilazione, formazione di reticolazioni covalenti, formazione di cisteina, formazione di piroglutammato, formilazione, gamma-carbossilazione, glicosilazione, formazione di dispositivo di ancoraggio GPI, idrossilazione, iodazione, metilazione, miristilazione, ossidazione, pegilazione, elaborazione proteolitica, fosforilazione, prenilazione, racemizzazione, selenilazione, solfatazione, aggiunta mediata da RNA transfer di amminoacidi a proteine come arginilazione, e ubiquitinazione. (Si veda, per esempio, PROTEINS--STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2° Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pagine 1-12 (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)).

In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente sono fissati a supporti solidi, che sono particolarmente utili per saggi immunologici o purificazione di polipeptidi che sono legati da, che si legano a o si associano a proteine descritte nella presente. Tali supporti solidi includono, in via non limitativa, vetro, cellulosa, poliacrilammide, nylon, polistirene, cloruro di polivinile o polipropilene.

Composizioni farmaceutiche

Inoltre, nella presente sono fornite composizioni farmaceutiche comprendenti un costrutto legante l'antigene descritto nella presente. Le composizioni farmaceutiche comprendono il costrutto e un carrier farmaceuticamente accettabile.

L'espressione "farmaceuticamente accettabile" indica approvato da un'agenzia regolatrice del governo federale o statale o elencato nella

farmacopea degli Stati Uniti o in un'altra farmacopea generalmente riconosciuta per l'uso negli animali, e più in particolare negli esseri umani. Il termine "carrier" si riferisce a un diluente, adiuvante, eccipiente o veicolo con cui è somministrata la sostanza terapeutica. Tali carrier farmaceutici possono essere liquidi sterili, come acqua e oli, inclusi quelli di origine petrolifera, animale, vegetale o sintetica, come olio di arachidi, olio di soia, olio minerale, olio di sesamo e simili. In alcuni aspetti, il carrier è un carrier artificiale non presente in natura. L'acqua può essere usata come carrier quando la composizione farmaceutica è somministrata per via endovenosa. Soluzioni saline e soluzioni acquose di destrosio e glicerolo possono anche essere impiegate come carrier liquidi, in particolare per soluzioni iniettabili. Eccipienti farmaceutici idonei includono amido, glucosio, lattosio, saccarosio, gelatina, malto, riso, farina, gesso, gel di silice, stearato di sodio, gliceril monostearato, talco, cloruro di sodio, latte scremato essiccato, glicerolo, propilene, glicole, acqua, etanolo e simili. Se desiderato, la composizione può anche contenere quantità minori di agenti umettanti o emulsionanti o agenti tampone per il pH. Queste composizioni possono assumere la forma di soluzioni, sospensioni, emulsione, compresse, pillole, capsule, polveri, formulazioni a rilascio prolungato e simili. La composizione può essere formulata come una supposta, con leganti tradizionali e carrier come trigliceridi. La formulazione orale può includere carrier standard come gradi farmaceutici di mannitolo, lattosio, amido, stearato di magnesio, saccarina sodica, cellulosa, carbonato di magnesio, eccetera. Esempi di carrier farmaceutici idonei sono descritti in "Remington's Pharmaceutical Sciences" di E. W. Martin. Tali composizioni contengono una quantità terapeuticamente efficace del composto, preferibilmente in forma purificata, insieme a una quantità idonea di carrier in modo da fornire la forma per la somministrazione appropriata al paziente. La formulazione dovrebbe adattarsi alla modalità di somministrazione.

In alcune forme di realizzazione, la composizione comprendente il costrutto è formulata in conformità con procedure di routine come una composizione farmaceutica atta alla somministrazione endovenosa negli esseri umani. Tipicamente, le composizioni per la somministrazione endovenosa sono soluzioni in tampone acquoso isotonicamente sterile. Laddove necessario, la composizione può anche includere un agente solubilizzante e un anestetico locale come lignocaina per alleviare il dolore nel sito dell'iniezione. In generale, gli ingredienti sono forniti separatamente o mescolati insieme in forma di dosaggio unitario, per esempio, come polvere liofilizzata essiccata o concentrato senza acqua in un contenitore chiuso ermeticamente come un'ampolla o bustina indicante la quantità di principio attivo. Laddove la composizione deve essere somministrata mediante infusione, può essere erogata con una bottiglia per infusione contenente acqua sterile di grado farmaceutico o soluzione salina. Laddove la composizione è somministrata mediante iniezione, può essere fornita un'ampolla di acqua sterile per iniezione o soluzione salina in modo tale che gli ingredienti possono essere mescolati prima della somministrazione.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni descritte nella presente sono formulate come forme neutre o saline. Sali

farmaceuticamente accettabili includono quelli formati con anioni come quelli ricavati da acido cloridrico, fosforico, acetico, ossalico, tartarico, eccetera e quelli formati con cationi come quelli ricavati da sodio, potassio, ammonio, calcio, idrossido ferrico, isopropilammina, trietilammina, 2-etilammino etanolo, istidina, procaina, eccetera.

Trattamento: Usi medici

In questa sezione e in tutto il testo, i riferimenti ai trattamenti e ai metodi di trattamento si riferiscono al costrutto per l'uso in quel trattamento o metodo. I metodi di trattamento non sono rivendicati.

Viene fornito un metodo di trattamento di una malattia o un disturbo comprendente somministrare a un soggetto, in cui è desiderato tale trattamento, prevenzione o miglioramento, un costrutto legante l'antigene descritto nella presente in una quantità efficace per trattare, prevenire o migliorare la malattia o il disturbo.

"Disturbo" si riferisce a qualsiasi condizione che trarrebbe beneficio dal trattamento con un costrutto legante l'antigene o metodo descritto nella presente. Questo include disturbi o malattie croniche e acute, incluse quelle condizioni patologiche che predispongono il mammifero al disturbo in questione. In alcune forme di realizzazione, il disturbo è il cancro, come descritto in modo maggiormente dettagliato di seguito.

Il termine "soggetto" si riferisce a un animale, in alcune forme di realizzazione un mammifero, che è l'oggetto di trattamento, osservazione o esperimento. Un animale può essere un essere umano, un primate non umano, un animale da compagnia (per esempio, cani, gatti e simili), un animale da fattoria (per esempio, mucche, pecore, maiali, cavalli e simili) o un animale da laboratorio (per esempio, ratti, topi, porcellini d'India e simili).

Il termine "mammifero", come usato nella presente, include, in via non limitativa, esseri umani, primati non umani, canini, felini, murini, bovini, equini e suini.

Il termine "trattamento" si riferisce a un intervento clinico nel tentativo di alterare il corso naturale del singolo o della cellula in trattamento e può essere eseguito per profilassi o durante il corso della patologia clinica. Gli effetti auspicabili del trattamento includono prevenire l'occorrenza o la ricomparsa della malattia, attenuazione dei sintomi, diminuzione di qualsiasi conseguenza patologica diretta o indiretta della malattia, prevenire metastasi, diminuire il tasso di progressione della malattia, miglioramento o palliazione dello stato della malattia e remissione o prognosi migliorata. In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente sono usati per ritardare lo sviluppo di una malattia o un disturbo. In una forma di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene e i metodi descritti nella presente effettuano la regressione del tumore. In una forma di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene e i metodi descritti nella presente effettuano l'inibizione della crescita del tumore/cancro.

Gli effetti auspicabili del trattamento includono, in via non limitativa, prevenire l'occorrenza o la ricomparsa della malattia, attenuazione dei sintomi, diminuzione di qualsiasi conseguenza patologica diretta o indiretta della malattia, prevenire metastasi, diminuire il tasso di progressione della malattia, miglioramento o palliazione dello stato della malattia e remissione o prognosi migliorata. In alcune forme di realizzazione, i costrutti descritti nella presente sono usati per ritardare lo sviluppo di una malattia o per rallentare la progressione di una malattia.

L'espressione "quantità efficace", come usato nella presente, si riferisce a quella quantità di costrutto somministrata che realizzerà l'obiettivo del metodo esposto, per esempio, attenuare in una certa misura uno o più dei sintomi della malattia, della condizione o del disturbo trattato. La quantità della composizione descritta nella presente che sarà efficace nel trattamento, inibizione e prevenzione di una malattia o disturbo associato a espressione e/o attività aberrante di una proteina terapeutica può essere determinata mediante tecniche cliniche standard. In aggiunta, facoltativamente, possono essere impiegati saggi in vitro per contribuire a identificare intervalli di dosaggio ottimali. La dose precisa da impiegare nella formulazione dipenderà anche dalla via di somministrazione e dalla gravità della malattia o del disturbo e dovrebbe essere decisa secondo il giudizio del medico specialista e delle circostanze di ciascun paziente. Dosi efficaci sono estrapolate da curve dose-risposta ricavate da sistemi di test in vitro o modelli animali.

Il costrutto legante l'antigene è somministrato al soggetto. Vari sistemi di somministrazione sono noti e possono essere usati per somministrare una formulazione di costrutto legante l'antigene descritta nella presente, per esempio, incapsulamento in liposomi, microparticelle, microcapsule, cellule ricombinanti in grado di esprimere il composto, endocitosi mediata da recettore (si veda, per esempio, Wu e Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), costrutto di un acido nucleico come parte di un vettore retrovirale o altro vettore, eccetera. I metodi di introduzione includono, in via non limitativa, vie intradermiche, intramuscolari, intraperitoneali, endovenose, sottocutanee, intranasali, epidurali e orali. I composti o le composizioni possono essere somministrati mediante qualsiasi via opportuna, per esempio mediante infusione o iniezione in bolo, mediante assorbimento attraverso rivestimento epiteliale o mucocutaneo (per esempio, mucosa orale, mucosa rettale e intestinale, eccetera) e possono essere somministrati insieme ad altri agenti biologicamente attivi. La somministrazione può essere sistemica o locale. In aggiunta, in alcune forme di realizzazione, è auspicabile introdurre le composizioni di costrutto legante l'antigene descritte nella presente nel sistema nervoso centrale mediante qualsiasi via idonea, inclusa iniezione intraventricolare e intratecale; l'iniezione intraventricolare può essere agevolata da un catetere intraventricolare, per esempio, fissato a un serbatoio, come un serbatoio Ommaya. Per esempio, la somministrazione polmonare può anche essere impiegata mediante l'uso di un inalatore o nebulizzatore e formulazione con un agente aerosolizzante.

In una forma di realizzazione specifica, è auspicabile somministrare i costrutti leganti l'antigene o le composizioni descritte nella presente

localmente nell'area che richiede trattamento; questo può essere ottenuto, per esempio, e non a titolo limitativo, mediante infusione locale durante l'intervento chirurgico, applicazione topica, per esempio, in combinazione con una garza dopo l'intervento chirurgico, mediante iniezione, per mezzo di un catetere, per mezzo di un supposta o per mezzo di un impianto, detto impianto essendo in un materiale poroso, non poroso o gelatinoso, incluse membrane, come membrane sialastiche o fibre. Preferibilmente, quando viene somministrata una proteina, incluso un costrutto legante l'antigene descritto nella presente, occorre prestare attenzione a usare materiali in cui la proteina non si assorbe.

In un'altra forma di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene o la composizione possono essere somministrati in una vescicola, in particolare un liposoma (si vedano Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein e Fidler (ed.), Liss, New York, pagine 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pagine 317-327; si veda in generale *ibid.*)

In un'ulteriore forma di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene o la composizione possono essere somministrati in un sistema a rilascio controllato. In una forma di realizzazione, può essere usata una pompa (si vedano Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). In un'altra forma di realizzazione, possono essere usati materiali polimerici (si vedano *Medical Applications of Controlled Release*, Langer e Wise (ed.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen e Ball (ed.), Wiley, New York (1984); Ranger e Peppas, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); si vedano anche Levy et al., *Science* 228:190 (1985); During et al., *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)). In un'ulteriore forma di realizzazione, un sistema a rilascio controllato può essere collocato in prossimità del target terapeutico, per esempio, il cervello, richiedendo pertanto soltanto una frazione della dose sistemica (si veda, per esempio, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, pagine 115-138 (1984)).

In una forma di realizzazione specifica comprendente un acido nucleico codificante costrutti leganti l'antigene descritti nella presente, l'acido nucleico può essere somministrato in vivo per favorire l'espressione della sua proteina codificata, realizzandolo come parte di un vettore di espressione di acido nucleico appropriato e somministrandolo in modo tale che diventi intracellulare, per esempio, mediante l'uso di un vettore retrovirale (si veda il brevetto statunitense n° 4,980,286), o mediante iniezione diretta o mediante l'uso di bombardamento di microparticelle (per esempio, una gene gun; Biolistic, Dupont), o rivestimento con lipidi o ricettori di superficie cellulare o agenti di trasfezione, o somministrandolo insieme a un peptide simile a homeobox che è noto per entrare nel nucleo (si veda, per esempio, Joliot et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1864-1868 (1991)), eccetera. In alternativa, un acido nucleico può essere introdotto per via intracellulare e incorporato all'interno del DNA della cellula ospite per l'espressione, mediante ricombinazione omologa.

In alcune forme di realizzazione, un costrutto legante l'antigene descritto nella presente è somministrato come una combinazione con costrutti leganti l'antigene con epitopi target di legame non sovrapposti.

La quantità del costrutto legante l'antigene che sarà efficace nel trattamento, nell'inibizione e nella prevenzione di una malattia o disturbo può essere determinata mediante tecniche cliniche standard. In aggiunta, facoltativamente, possono essere impiegati saggi in vitro per contribuire a identificare intervalli di dosaggio ottimali. La dose precisa da impiegare nella formulazione dipenderà anche dalla via di somministrazione e dalla gravità della malattia o del disturbo e dovrebbe essere decisa secondo il giudizio del medico specialista e delle circostanze di ciascun paziente. Dosi efficaci sono estrapolate da curve dose-risposta ricavate da sistemi di test in vitro o modelli animali.

I costrutti leganti l'antigene descritti nella presente possono essere somministrati da soli o in combinazione con altri tipi di trattamenti (per esempio, radioterapia, chemioterapia, terapia ormonale, immunoterapia e agenti antitumorali). In generale, è preferita la somministrazione di prodotti di un'origine di specie o reattività di specie (nel caso di anticorpi) che è la stessa specie di quella del paziente. Pertanto, in una forma di realizzazione, costrutti leganti l'antigene, frammenti derivati, analoghi o acidi nucleici umani sono somministrati a un paziente umano per terapia o profilassi.

Trattamento del cancro

Nella presente sono descritti metodi di trattamento di un cancro HER2+ o di un tumore in un soggetto e metodi di inibizione della crescita di una cellula tumorale HER2+ o di uccisione di una cellula tumorale HER2+ usando i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente.

Per cancro HER2+ si intende un cancro che esprime HER2, in modo tale che i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente siano in grado di legarsi al cancro. Come è noto nella tecnica, i cancri HER2+ esprimono HER2 a livelli variabili. Per determinare l'espressione di ErbB, per esempio ErbB2 (HER2) nel cancro, sono disponibili vari saggi diagnostici/prognostici. In una forma di realizzazione, la sovraespressione di ErbB2 può essere analizzata mediante IHC, per esempio usando HERCEPTEST® (Dako). Sezioni di tessuto incorporato in paraffina di una biopsia tumorale possono essere sottoposte al saggio IHC e ad esse assegnato un criterio di intensità di colorazione della proteina ErbB2 come segue: Punteggio 0: non è osservata alcuna colorazione o è osservata una colorazione della membrana in meno del 10% delle cellule tumorali.

Punteggio 1+: è rilevata una colorazione della membrana debole/appena percettibile in più del 10% delle cellule tumorali. Le cellule sono colorate soltanto in parte della loro membrana.

Punteggio 2+: è osservata una colorazione della membrana completa da debole a moderata in più del 10% delle cellule tumorali.

Punteggio 3+: è osservata una colorazione della membrana completa da moderata a forte in più del 10% delle cellule tumorali.

Quei tumori con punteggi 0 o 1+ per la valutazione della sovraespressione di ErbB2 possono essere caratterizzati come non sovraesprimenti ErbB2, mentre quei tumori con punteggi 2+ o 3+ possono essere caratterizzati come sovraesprimenti ErbB2.

In alternativa o in aggiunta, i saggi di ibridazione fluorescente in situ (FISH) come INFORM™ (venduto da Ventana, Ariz.) o PATHVISION™ (Vysis, Ill.) possono essere effettuati su tessuto tumorale fissato in formalina e incorporato in paraffina per determinare l'estensione (se presente) della sovraespressione di ErbB2 nel tumore. Rispetto al saggio IHC, il saggio FISH, che misura l'amplificazione del gene HER2, sembra eseguire una correlazione migliore con la risposta dei pazienti al trattamento con HERCEPTIN® ed è attualmente considerato il saggio preferito per identificare i pazienti che probabilmente beneficeranno del trattamento con HERCEPTIN®.

La Tabella D descrive il livello di espressione di HER2 su svariate linee cellulari rappresentative di cancro mammario e altri tipi di cancro (Subik et al. (2010) Breast Cancer: Basic Clinical Research:4; 35-41; Prang et a. (2005) British Journal of Cancer Research:92; 342-349). Come mostrato nella tabella, le cellule MCF-7 e MDA-MB-231 sono considerate cellule a bassa espressione di HER2; le cellule JIMT-1 e ZR-75-1 sono considerate cellule a media espressione di HER2 e le cellule SKBR3 e BT-474 sono considerate cellule ad alta espressione di HER2. Le cellule SKOV3 (cancro ovarico) sono considerate cellule a media espressione di HER2.

Nella presente sono descritti metodi di trattamento di un soggetto avente un cancro HER2+ o un tumore comprendente somministrare al soggetto una quantità efficace di una composizione farmaceutica comprendente un costrutto legante l'antigene descritto nella presente.

Nella presente è descritto anche l'uso di un costrutto legante l'antigene HER2 descritto nella presente per la fabbricazione di un medicinale per il trattamento di un cancro o un tumore. Sono descritti nella presente anche costrutti leganti l'antigene HER2 per l'uso nel trattamento di un cancro o un tumore.

In forme di realizzazione specifiche, il costrutto legante l'antigene è v10000, v5019 o v7091, v5019 o v5020. In una forma di realizzazione, il costrutto legante l'antigene è v10000. In alcune forme di realizzazione, il costrutto legante l'antigene è coniugato a maitansina (DM1). Quando il costrutto legante l'antigene coniugato a DM1 è internalizzato nelle cellule tumorali, DM1 è clivato dal costrutto a livello intracellulare e uccide le cellule tumorali.

In alcune forme di realizzazione, il soggetto in trattamento ha cancro pancreatico, cancro della testa e del collo, cancro gastrico, cancro coloretale, cancro mammario, cancro renale, cancro cervicale, cancro ovarico, cancro cerebrale, cancro endometriale, cancro alla vescica, cancro al polmone non a piccole cellule o un cancro di derivazione epidermica. In alcune forme di realizzazione, il tumore è metastatico.

In generale, il tumore nel soggetto in trattamento esprime una media di 10.000 o più copie di HER2 per cellula tumorale. In alcune forme

di realizzazione, il tumore è HER2 0-1+, 1+, HER2 2+ o HER2 3+ come determinato mediante IHC. In alcune forme di realizzazione, il tumore è HER2 2+ o inferiore o HER2 1+ o inferiore.

In alcune forme di realizzazione, il tumore del soggetto in trattamento con i costrutti leganti l'antigene è un cancro mammario. In una forma di realizzazione specifica, il cancro mammario esprime HER2 a un livello 2+ o inferiore. In una forma di realizzazione specifica, il cancro mammario esprime HER2 a un livello 1+ o inferiore. In alcune forme di realizzazione, il cancro mammario esprime recettori degli estrogeni (ER+) e/o recettori del progesterone (PR+). In alcune forme di realizzazione, il cancro mammario è ER- e/o PR-. In alcune forme di realizzazione, il cancro mammario ha un gene HER2 amplificato. In alcune forme di realizzazione, il cancro mammario è un cancro mammario duttale invasivo HER2 3+ negativo al recettore degli estrogeni (ER-), negativo al recettore del progesterone (PR-), resistente a trastuzumab, resistente alla chemioterapia. In un'altra forma di realizzazione, il cancro mammario è un cancro mammario infiammatorio HER2 3+ ER-, PR-, resistente a trastuzumab. In un'altra forma di realizzazione, il cancro mammario è un carcinoma duttale invasivo HER2 3+, ER-, PR-. In un'altra forma di realizzazione, il cancro mammario è un cancro mammario HER2 2+ con gene HER2 amplificato, resistente a trastuzumab e pertuzumab. In alcune forme di realizzazione, il cancro mammario è triplo negativo (ER-, PR- e con bassa espressione di HER2).

In una forma di realizzazione, il tumore è un adenocarcinoma epiteliale ovarico HER2 2/3+ avente un gene HER2 amplificato.

Nella presente sono forniti metodi per trattare un soggetto avente un tumore HER2+ che è resistente o sta diventando resistente ad altre terapie di standard di cura, comprendenti somministrare al soggetto una composizione farmaceutica comprendente i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente. In alcune forme di realizzazione, i costrutti leganti l'antigene descritti nella presente sono forniti a soggetti che non rispondono alle terapie attuali, facoltativamente in combinazione con una o più terapie anti-HER2 attuali. In alcune forme di realizzazione, le terapie anti-HER2 attuali includono, in via non limitativa, anticorpi bivalenti monospecifici anti-HER2 o anti-HER3, trastuzumab, pertuzumab, T-DM1, HER2/HER3 scFv bispecifico o relative combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il cancro è resistente a vari agenti chemioterapici come i taxani. In alcune forme di realizzazione, il cancro è resistente a trastuzumab. In una forma di realizzazione, il cancro è resistente a pertuzumab. In una forma di realizzazione, il cancro è resistente a TDM1 (trastuzumab coniugato a DM1). In alcune forme di realizzazione, il soggetto è stato precedentemente trattato con un anticorpo anti-HER2 come trastuzumab, pertuzumab o DM1. In alcune forme di realizzazione, il soggetto non è stato precedentemente trattato con un anticorpo anti-HER2. In una forma di realizzazione, il costrutto legante l'antigene è fornito a un soggetto per il trattamento di cancro metastatico quando il paziente è progredito su una precedente terapia anti-HER2.

Nella presente sono forniti metodi di trattamento di un soggetto avente un tumore HER2+ comprendenti fornire una quantità efficace di

una composizione farmaceutica comprendente un costrutto legante l'antigene descritto nella presente in combinazione con un agente antitumorale aggiuntivo. L'agente antitumorale aggiuntivo può essere un anticorpo terapeutico, come indicato sopra, o un agente chemioterapico. Agenti chemioterapici utili per l'uso in combinazione con i costrutti leganti l'antigene dell'invenzione includono cisplatino, carboplatino, paclitaxel, paclitaxel legato all'albumina, docetaxel, gemcitabina, vinorelbina, irinotecan, etoposide, vinblastina, pemetrexed, 5-fluorouracile (con o senza acido folinico), capecitabina, carboplatino, epirubicina, oxaliplatino, folfirinolo, abraxane e ciclofosfamide.

In alcune forme di realizzazione, il tumore è un cancro al polmone non a piccole cellule e l'agente aggiuntivo è uno o più tra cisplatino, carboplatino, paclitaxel, paclitaxel legato all'albumina, docetaxel, gemcitabina, vinorelbina, irinotecan, etoposide, vinblastina o pemetrexed. Nelle forme di realizzazione, il tumore è un cancro gastrico o dello stomaco e l'agente aggiuntivo è uno o più tra 5-fluorouracile (con o senza acido folinico), capecitabina, carboplatino, cisplatino, docetaxel, epirubicina, irinotecan, oxaliplatino o paclitaxel. In altre forme di realizzazione, il tumore è un cancro pancreatico e l'agente aggiuntivo è uno o più tra gemcitabina, folfirinolo, abraxane o 5-fluorouracile. In altre forme di realizzazione, il tumore è un cancro mammario positivo agli estrogeni e/o al progesterone e l'agente aggiuntivo è uno o più di una combinazione di (a) doxorubicina ed epirubicina, (b) una combinazione di paclitaxel e docetaxel o (c) una combinazione di 5-fluorouracile, ciclofosfamide e carboplatino. In altre forme di realizzazione, il tumore è un cancro della testa e del collo e l'agente aggiuntivo è uno o più tra paclitaxel, carboplatino, doxorubicina o cisplatino. In altre forme di realizzazione, il tumore è un cancro ovarico e l'agente aggiuntivo può essere uno o più tra cisplatino, carboplatino o un taxano come paclitaxel o docetaxel.

Gli agenti aggiuntivi possono essere somministrati al soggetto in trattamento contemporaneamente con i costrutti leganti l'antigene o sequenzialmente.

Il soggetto in trattamento con i costrutti leganti l'antigene può essere un umano, un primate non umano o un altro mammifero, come un topo.

In alcune forme di realizzazione, il risultato di fornire una quantità efficace del costrutto legante l'antigene a un soggetto avente un tumore è ridurre il tumore, inibire la crescita del tumore, aumentare il tempo della progressione del tumore, prolungare la sopravvivenza libera da malattia del soggetto, diminuire le metastasi, aumentare la sopravvivenza libera da progressione del soggetto o aumentare la sopravvivenza globale del soggetto o aumentare la sopravvivenza globale di un gruppo di soggetti che ricevono il trattamento.

Sono anche descritti nella presente i metodi di uccisione o inibizione della crescita di una cellula tumorale esprimente HER2 comprendente far entrare a contatto la cellula con il costrutto legante l'antigene fornito nella presente.

In varie forme di realizzazione, una cellula tumorale può essere una cellula di carcinoma pancreatico umano HER2 1+ o 2+, una cellula di carcinoma polmonare umano HER2 3+, una cellula di carcinoma bronchioalveolare caucasico umano HER2 2+, una cellula di carcinoma faringeo umano, una cellula di carcinoma a cellule squamose della lingua umana HER2 2+, una cellula di carcinoma a cellule squamose HER2 2+ della faringe, una cellula di carcinoma coloretale umano HER2 1+ o 2+, una cellula di carcinoma gastrico umano HER2 3+, una cellula di carcinoma duttale mammario umano HER2 1+ ER+ (positivo al recettore degli estrogeni), una cellula di carcinoma mammario umano HER2 2+/3+ ER+ amplificato con HER2, una cellula di carcinoma mammario umano HER2 0+/1+ triplo negativo, una cellula di carcinoma endometriode umano HER2 2+, una cellula di melanoma maligno metastatico polmonare HER2 1+, una cellula di carcinoma della cervice umana HER2 1+, una cellula di carcinoma a cellule renali umano HER2 1+ o una cellula di carcinoma ovarico umano HER2 1+.

In forme di realizzazione in cui i costrutti leganti l'antigene sono coniugati a DM1, la cellula tumorale può essere una cellula di carcinoma pancreatico umano HER2 1+ o 2+ o 3+, una cellula di carcinoma pancreatico metastatico HER2 2+, una cellula di carcinoma polmonare umano HER2 0+/1+, +3+, una cellula di carcinoma bronchioalveolare caucasico umano HER2 2+, un carcinoma polmonare anaplastico HER2 0+, una cellula di carcinoma polmonare umano non a piccole cellule, una cellula di carcinoma faringeo umano, una cellula di carcinoma a cellule squamose della lingua umano HER2 2+, una cellula di carcinoma a cellule squamose HER2 2+ della faringe, una cellula di carcinoma coloretale umano HER2 1+ o 2+, una cellula di carcinoma gastrico umano HER2 0+, 1+ o 3+, una cellula di carcinoma duttale mammario umano HER2 1+ ER+ (positivo al recettore degli estrogeni), una cellula di carcinoma mammario umano HER2 2+/3+ ER+ con HER2 amplificato, una cellula di carcinoma mammario umano HER2 0+/1+ triplo negativo, una cellula di carcinoma duttale mammario umano HER2 0+ (basale B, triplo negativo di tipo mesenchimale), una cellula di carcinoma mammario HER2 2+ ER+, una cellula di carcinoma mammario metastatico umano HER2 0+ (ER-, amplificato con HER2, luminale A, TN), una cellula di tumore mesodermico dell'utero umano (grado misto III), una cellula di carcinoma endometriode umano 2+, una cellula di carcinoma epidermoidale della pelle umano HER2 1+, una cellula di melanoma maligno metastatico polmonare HER2 1+, una cellula di melanoma maligno HER2 1+, una cellula di carcinoma epidermoidale della cervice umana, una cellula di carcinoma della vescica urinaria umano HER2 1+, una cellula di carcinoma della cervice umana HER2 1+, una cellula di carcinoma delle cellule renali umano HER2 1+ o una cellula di carcinoma ovarico umano HER2 1+, 2+ o 3+.

In alcune forme di realizzazione, la cellula tumorale può essere una o più delle seguenti linee cellulari (mostrate nelle Figure 37 e 38): linee cellulari tumorali pancreatiche BxPC3, Capan-1, MiaPaca2; linee cellulari tumorali polmonari Calu-3, NCI-H322; linee cellulari tumorali della testa e del collo Detroit 562, SCC-25, FaDu; linee cellulari tumorali coloretali HT29, SNU-C2B; linea cellulare tumorale gastrica NCI-N87; linee

cellulari tumorali mammarie MCF-7, MDAMB175, MDAMB361, MDA-MB-231, BT-20, JIMT-1, SkBr3, BT-474; linea cellulare tumorale uterina TOV-112D; linea cellulare tumorale cutanea Malme-3M; linee cellulari tumorali cervicali Caski, MS751; linea cellulare tumorale della vescica T24, linee cellulari tumorali ovariche CaOV3 e SKOV3.

In alcune forme di realizzazione in cui i costrutti leganti l'antigene sono coniugati a DM1, la cellula tumorale può essere una o più delle seguenti linee cellulari (mostrate nelle Figure 37 e 38): linee cellulari tumorali pancreatiche BxPC3, Capan-1, MiaPaca2, SW 1990, Panc1; linee cellulari tumorali polmonari A549, Calu-3, Calu-6, NCI-H2126, NCI-H322; linee cellulari tumorali della testa e del collo Detroit 562, SCC-15, SCC-25, FaDu; linee cellulari tumorali coloretali Colo201, DLD-1, HCT116, HT29, SNU-C2B; linee cellulari tumorali gastriche SNU-1, SNU-16, NCI-N87; linee cellulari tumorali mammarie SkBr3, MCF-7, MDAMB175, MDAMB361, MDA-MB-231, ZR-75-1, BT-20, BT549, BT-474, CAMA-1, MDAMB453, JIMT-1, T47D; linee cellulari tumorali uterine SK-UT-1, TOV-112D; linee cellulari tumorali cutanee A431, Malme-3M, SKEMEL28; linee cellulari tumorali cervicali Caski, MS751; linea cellulare tumorale della vescica T24, linea cellulare tumorale renale ACHN; linee cellulari tumorali ovariche CaOV3, Ovar-3 e SKOV3.

Kit e articoli di fabbricazione

Nella presente sono descritti anche kit comprendenti uno o più costrutti leganti l'antigene. Singoli componenti del kit possono essere imballati in contenitori separati e, associato a tali contenitori, può esservi un avviso nella forma prescritta da un'agenzia governativa che regola la fabbricazione, l'uso o la vendita di prodotti farmaceutici o biologici, il quale avviso riflette l'approvazione da parte dell'agenzia di fabbricazione, uso o vendita. Il kit può contenere facoltativamente istruzioni o indicazioni che delineano il metodo di uso o regime di somministrazione per il costrutto legante l'antigene.

Quando uno o più componenti del kit sono forniti come soluzioni, per esempio una soluzione acquosa o una soluzione acquosa sterile, i mezzi del contenitore possono essere essi stessi un inalatore, siringa, pipetta, contagocce o altro apparecchio simile, da cui la soluzione può essere somministrata a un soggetto o applicata e miscelata con gli altri componenti del kit.

I componenti del kit possono anche essere forniti in forma essiccata o liofilizzata e il kit può contenere in aggiunta un solvente idoneo per la ricostituzione dei componenti liofilizzati. Indipendentemente dal numero o dal tipo di contenitori, i kit descritti nella presente possono anche comprendere uno strumento per fornire assistenza a un paziente per la somministrazione della composizione. Tale strumento può essere un inalatore, dispositivo spray nasale, siringa, pipetta, pinza, cucchiaio misurato, contagocce o simile veicolo di somministrazione approvato medicalmente.

In un altro aspetto descritto nella presente (ma non rivendicato), è fornito un articolo di fabbricazione contenente materiali utili per il

trattamento, la prevenzione e/o diagnosi dei disturbi descritti sopra. L'articolo di fabbricazione comprende un contenitore e un'etichetta o inserto di confezionamento sul o associato al contenitore. Contenitori idonei includono, per esempio, bottiglie, fiale, siringhe, sacche per soluzione IV, eccetera. I contenitori possono essere formati da una varietà di materiali come vetro o plastica. Il contenitore contiene una composizione che è da sola o combinata con un'altra composizione efficace per trattare, prevenire e/o diagnosticare la condizione e può avere un'apertura di accesso sterile (per esempio, il contenitore può essere una sacca per soluzione intravenosa o una fiala avente un otturatore perforabile da un ago per iniezione ipodermica). Almeno un agente attivo nella composizione è un costrutto legante l'antigene attivante le cellule T descritto nella presente. L'etichetta o l'inserto del pacchetto indica che la composizione è usata per trattare la condizione scelta. Inoltre, l'articolo di fabbricazione può comprendere (a) un primo contenitore con una composizione al suo interno, in cui la composizione comprende un costrutto legante l'antigene descritto nella presente; e (b) un secondo contenitore con una composizione al suo interno, in cui la composizione comprende un ulteriore agente citotossico o comunque terapeutico. In questa forma di realizzazione descritta nella presente, l'articolo di fabbricazione può comprendere inoltre un inserto del pacchetto che indica che le composizioni possono essere usate per trattare una particolare condizione. In alternativa o in aggiunta, l'articolo di fabbricazione può comprendere inoltre un secondo (o terzo) contenitore comprendente un tampone farmaceuticamente accettabile, come acqua batteriostatica per iniezione (BWFI), soluzione salina tamponata con fosfato, soluzione di Ringer e soluzione di destrosio. Può includere inoltre altri materiali auspicabili dal punto di vista commerciale e dell'utilizzatore, inclusi altri tamponi, diluenti, filtri, aghi e siringhe.

Polipeptidi e polinucleotidi

I costrutti leganti l'antigene descritti nella presente comprendono almeno un polipeptide. Sono inoltre descritti polinucleotidi che codificano i polipeptidi descritti nella presente. I costrutti leganti l'antigene sono tipicamente isolati.

Come usato nella presente, "isolato" indica un agente (per esempio, un polipeptide o un polinucleotide) che è stato identificato e separato e/o recuperato da un componente del suo ambiente naturale di coltura cellulare. Componenti contaminanti del suo ambiente naturale sono materiali che interferirebbero con usi diagnostici o terapeutici per il costrutto legante l'antigene e possono includere enzimi, ormoni e altri soluti proteici o non proteici. Isolato inoltre si riferisce a un agente che è stato prodotto sinteticamente, per esempio, tramite intervento umano.

I termini "polipeptide," "peptide" e "proteina" sono usati in modo intercambiabile nella presente per riferirsi a un polimero di residui di amminoacido. Vale a dire che una descrizione che riguarda un polipeptide si applica ugualmente a una descrizione di un peptide e a una descrizione di una proteina e viceversa. I termini si applicano a polimeri amminoacidici presenti in natura nonché a polimeri amminoacidici in cui uno o più residui di amminoacido sono un amminoacido codificato non naturalmente. Come usati nella presente, i termini comprendono catene amminoacidiche

di qualsiasi lunghezza, incluse proteine a lunghezza intera, in cui i residui di amminoacido sono collegati mediante legami peptidici covalenti.

Il termine "amminoacido" si riferisce ad amminoacidi presenti in natura e non presenti in natura, nonché ad analoghi amminoacidici e mimetici amminoacidici che funzionano analogamente agli amminoacidi presenti in natura. Gli amminoacidi codificati naturalmente sono i 20 amminoacidi comuni (alanina, arginina, asparagina, acido aspartico, cisteina, glutammina, acido glutammico, glicina, istidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina) e pirrolisina e selenocisteina. Analoghi amminoacidici si riferisce a composti che hanno la stessa struttura chimica di base di un amminoacido presente in natura, vale a dire un α carbonio che è legato a un idrogeno, un gruppo carbossile, un gruppo amminico e un gruppo R, come, omoserina, norleucina, metionina solfossido, metionina metile solfonio. Tali analoghi hanno gruppi R modificati (come norleucina) o strutture portanti peptidiche modificate, tuttavia, trattengono la stessa struttura chimica di base di un amminoacido presente in natura. Il riferimento a un amminoacido include, per esempio, L-amminoacidi proteogenici presenti in natura; D-amminoacidi, amminoacidi chimicamente modificati come varianti e derivati amminoacidici; amminoacidi non proteogenici presenti in natura come β -alanina, ornitina, eccetera; e composti chimicamente sintetizzati aventi proprietà note nella tecnica per essere caratteristiche degli amminoacidi. Esempi di amminoacidi non presenti in natura includono, in via non limitativa, α -metil amminoacidi (per esempio, α -metil alanina), D-amminoacidi, amminoacidi simili all'istidina (per esempio, 2-ammino-istidina, β -idrossi-istidina, omoistidina), amminoacidi aventi un metilene extra nella catena laterale ("omo" amminoacidi), e amminoacidi in cui un gruppo funzionale di acido carbossilico nella catena laterale è sostituito con un gruppo acido solfonico (per esempio, acido cisteico). L'incorporazione di amminoacidi non naturali, inclusi amminoacidi non nativi sintetici, amminoacidi sostituiti o uno o più D-amminoacidi nelle proteine della presente invenzione può essere vantaggiosa in un certo numero di modi differenti. Peptidi contenenti D-amminoacidi, eccetera, mostrano una stabilità aumentata in vitro o in vivo rispetto alle controparti contenenti L-amminoacidi. Pertanto, la realizzazione di peptidi, eccetera, che incorporano D-amminoacidi può essere particolarmente utile quando è desiderata o richiesta una maggiore stabilità intracellulare. Più in particolare, i D-peptidi, eccetera, sono resistenti alle peptidasi e proteasi endogene, fornendo in questo modo una biodisponibilità migliorata della molecola e tempi di vita prolungati in vivo quando tali proprietà sono auspicabili. Inoltre, i D-peptidi, eccetera, non possono essere processati in modo efficiente per la presentazione ristretta del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II alle cellule T helper e, di conseguenza, sono meno propensi a indurre risposte immunitarie umorali nell'intero organismo.

Gli amminoacidi possono essere indicati nella presente mediante i loro simboli a tre lettere comunemente noti o mediante i simboli a una lettera raccomandati da IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Analogamente, i nucleotidi possono essere indicati mediante i loro codici a una lettera comunemente accettati.

Sono anche inclusi nell'invenzione i polinucleotidi che codificano polipeptidi dei costrutti leganti l'antigene. Il termine "polinucleotide" o "sequenza nucleotidica" è destinato ad indicare un tratto consecutivo di due o più molecole di nucleotide. La sequenza nucleotidica può essere di origine genomica, cDNA, RNA, semisintetica o sintetica o qualsiasi relativa combinazione.

Il termine "acido nucleico" si riferisce a desossiribonucleotidi, desossiribonucleosidi, ribonucleosidi o ribonucleotidi e relativi polimeri in forma a singolo o doppio filamento. A meno che non sia specificatamente limitato, il termine comprende acidi nucleici contenenti analoghi noti di nucleotidi naturali che hanno proprietà di legame simili all'acido nucleico di riferimento e sono metabolizzati in un modo simile ai nucleotidi presenti in natura. A meno che non sia specificatamente limitato in altro modo, il termine si riferisce anche ad analoghi di oligonucleotide, incluso PNA (acido peptidonucleico), analoghi di DNA usati nella tecnologia antisense (fosforotioati, fosforoamidati e simili). A meno che non sia indicato in altro modo, una particolare sequenza di acido nucleico comprende implicitamente relative varianti modificate in modo conservativo (incluse, in via non limitativa, sostituzioni di codoni degenerati) e sequenze complementari nonché la sequenza esplicitamente indicata. Nello specifico, sostituzioni di codoni degenerati possono essere ottenute generando sequenze in cui la terza posizione di uno o più codoni selezionati (o tutti) è sostituita con residui di basi miste e/o deossinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

"Varianti modificate in modo conservativo" si applica sia alle sequenze amminoacidiche sia a quelle degli acidi nucleici. Rispetto a particolari sequenze di acidi nucleici, "varianti modificate in modo conservativo" si riferisce a quegli acidi nucleici che codificano sequenze amminoacidiche identiche o essenzialmente identiche, o in cui l'acido nucleico non codifica una sequenza amminoacidica, in sequenze essenzialmente identiche. A causa della degenerazione del codice genetico, un numero cospicuo di acidi nucleici funzionalmente identici codifica una qualsiasi proteina data. Per esempio, i codoni GCA, GCC, GCG e GCU codificano tutti l'amminoacido alanina. Pertanto, in ogni posizione in cui un'alanina è specificata da un codone, il codone può essere modificato in uno qualsiasi dei codoni corrispondenti descritti senza alterare il polipeptide codificato. Tali variazioni di acido nucleico sono "variazioni silenziose," che sono una specie di variazioni modificate in modo conservativo. Ogni sequenza di acido nucleico nella presente che codifica un polipeptide descrive anche ogni possibile variazione silente dell'acido nucleico. Una persona mediamente esperta nella tecnica riconoscerà che ciascun codone in un acido nucleico (eccetto AUG, che è ordinariamente l'unico codone per metionina, e TGG, che è ordinariamente l'unico codone per triptofano) può essere modificato per produrre una molecola funzionalmente identica. Di conseguenza, ciascuna variazione silente di un acido nucleico che codifica un polipeptide è implicita in ciascuna sequenza descritta.

Per quanto riguarda le sequenze amminoacidiche, una persona mediamente esperta nella tecnica riconoscerà che singole sostituzioni,

delezioni o aggiunte a una sequenza di acido nucleico, peptide, polipeptide o proteina, che altera, aggiunge o elimina un singolo amminoacido o una ridotta percentuale di amminoacidi nella sequenza codificata, è una "variante modificata in modo conservativo", in cui l'alterazione ha come risultato la delezione di un amminoacido, l'aggiunta di un amminoacido o la sostituzione di un amminoacido con un amminoacido chimicamente simile. Tabelle di sostituzione conservativa che forniscono amminoacidi funzionalmente simili sono note alle persone mediamente esperte nella tecnica. Tali varianti modificate in modo conservativo sono aggiuntive e non escludono varianti polimorfiche, omologhi interspecie e alleli descritti nella presente.

Tabelle di sostituzione conservativa che forniscono amminoacidi funzionalmente simili sono note alle persone mediamente esperte nella tecnica. I seguenti otto gruppi contengono ciascuno amminoacidi che sono sostituzioni conservative tra loro: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Acido aspartico (D), Acido glutammico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); e [0139] 8) Cisteina (C), Metionina (M) (si veda, per esempio, Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2a edizione (Dicembre 1993)

I termini "identico" o "identità" percentuale, nel contesto di due o più acidi nucleici o sequenze polipeptidiche, si riferiscono a due o più sequenze o subsequenze che sono uguali. Le sequenze sono "sostanzialmente identiche" se hanno una percentuale di residui amminoacidici o nucleotidi uguale (vale a dire circa il 60% di identità, circa il 65%, circa il 70%, circa il 75%, circa l'80%, circa l'85%, circa il 90% o circa il 95% di identità in una regione specificata), quando confrontate e allineate per la massima corrispondenza su una finestra di confronto, o regione progettata come misurato usando uno dei seguenti algoritmi di confronto di sequenze (o altri algoritmi disponibili a persone di ordinaria competenza nella tecnica) o mediante allineamento manuale e ispezione visiva. Questa definizione si riferisce anche al complemento di una sequenza di test. L'identità può esistere in una regione che ha una lunghezza di almeno circa 50 amminoacidi o nucleotidi o in una regione che ha una lunghezza di 75-100 amminoacidi o nucleotidi o, laddove non specificato, per l'intera sequenza di un polinucleotide o polipeptide. Un polinucleotide che codifica un polipeptide della presente invenzione, inclusi omologhi da specie diverse dall'umano, può essere ottenuto mediante un procedimento comprendente le fasi di sottoporre a screening una libreria in condizioni di ibridazione stringenti con una sonda marcata avente una sequenza polinucleotidica descritta nella presente o un relativo frammento, e isolare cDNA a lunghezza intera e cloni genomici contenenti detta sequenza polinucleotidica. Tali tecniche di ibridazione sono note a una persona esperta nella tecnica.

Per il confronto di sequenze, tipicamente una sequenza funge da sequenza di riferimento, con cui sono confrontate le sequenze di test. Quando viene usato un algoritmo di confronto di sequenze, le sequenze di test e di riferimento sono inserite in un computer, le coordinate delle sottosequenze sono progettate, se necessario, e i parametri del programma dell'algoritmo di sequenza sono progettati. Possono essere usati i parametri

di programma predefiniti oppure possono essere progettati parametri alternativi. L'algoritmo di confronto di sequenze calcola in seguito le identità di sequenze percentuali per le sequenze di test rispetto alla sequenza di riferimento in base ai parametri del programma.

Una "finestra di confronto", come usato nella presente, include il riferimento a un segmento di una qualsiasi delle posizioni contigue selezionate dal gruppo costituito da 20 a 600, solitamente da circa 50 a circa 200, più solitamente da circa 100 a circa 150, in cui una sequenza può essere confrontata con una sequenza di riferimento dello stesso numero di posizioni contigue dopo che le due sequenze sono allineate in modo ottimale. Metodi di allineamento di sequenze per confronto sono noti alle persone mediamente esperte nella tecnica. L'allineamento ottimale di sequenze per confronto può essere eseguito, incluso in via non limitativa, mediante l'algoritmo di omologia locale di Smith e Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, mediante l'algoritmo di allineamento per omologia di Needleman e Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante il metodo di ricerca per similarità di Pearson e Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, mediante implementazioni computerizzate di questi algoritmi (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA nel Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) o mediante allineamento manuale e ispezione visiva (si veda, per esempio, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplemento)).

Esempi di un algoritmo che è idoneo per determinare l'identità di sequenza percentuale e la similarità di sequenza sono gli algoritmi BLAST e BLAST 2.0, che sono descritti rispettivamente in Altschul et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, e Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. Il software per eseguire l'analisi BLAST è disponibile pubblicamente attraverso il National Center for Biotechnology Information disponibile sul web in ncbi.nlm.nih.gov. I parametri W, T e X dell'algoritmo BLAST determinano la sensibilità e la velocità dell'allineamento. Il programma BLASTN (per sequenze nucleotidiche) usa come impostazioni predefinite una lunghezza della parola (W) di 11, un'aspettativa (E) di 10, M=5, N=-4 e un confronto di entrambi i filamenti. Per le sequenze amminoacidiche, il programma BLASTP usa come impostazioni predefinite una lunghezza della parola di 3, un'aspettativa (E) di 10, e allineamenti (B) di matrice di punteggio BLOSUM62 (si veda Henikoff e Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) di 50, aspettativa (E) di 10, M=5, N=-4, e un confronto di entrambi i filamenti. Tipicamente, l'algoritmo BLAST è eseguito con il filtro "bassa complessità" disattivato.

L'algoritmo BLAST esegue anche un'analisi statistica della similarità tra due sequenze (si veda, per esempio, Karlin e Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Una misura di similarità fornita dall'algoritmo BLAST è la probabilità di somma minima (P(N)), che fornisce un'indicazione della probabilità con cui una corrispondenza tra due sequenze nucleotidiche o amminoacidiche può verificarsi per caso. Per esempio, un acido nucleico è considerato simile a una sequenza di riferimento se la probabilità di somma minima in un confronto dell'acido nucleico di test con l'acido nucleico di riferimento è inferiore a circa 0,2, o inferiore a circa 0,01, o inferiore a circa 0,001.

La frase "si ibrida selettivamente (o nello specifico) a" si riferisce al legame, all'elaborazione a doppio canale o all'ibridazione di una molecola soltanto a una particolare sequenza nucleotidica in condizioni di ibridazione stringenti quando quella sequenza è presente in una miscela complessa (incluso, in via non limitativa, DNA o RNA cellulare totale o di libreria).

La frase "condizioni di ibridazione stringenti" si riferisce all'ibridazione di sequenze di DNA, RNA o altri acidi nucleici o relative combinazioni in condizioni di bassa intensità ionica e alta temperatura come è noto nella tecnica. Tipicamente, in condizioni stringenti, una sonda si ibriderà alla sua sottosequenza target in una miscela complessa di acido nucleico (incluso, in via non limitativa, DNA o RNA cellulare totale o di libreria) ma non si ibiderà ad altre sequenze nella miscela complessa. Le condizioni stringenti sono dipendenti dalla sequenza e saranno differenti in circostanze differenti. Sequenze più lunghe ibridano specificatamente a temperature più alte. Una guida dettagliata all'ibridazione degli acidi nucleici si trova in Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993).

Come usato nella presente, viene considerato che i termini "ingegnerizzare, ingegnerizzato, ingegnerizzazione" includono qualsiasi manipolazione della struttura portante del peptide o delle modificazioni post-traduzionali di un polipeptide presente in natura o ricombinante o relativo frammento. L'ingegnerizzazione include modifiche della sequenza amminoacidica, del pattern di glicosilazione o del gruppo della catena laterale di singoli amminoacidi, nonché combinazioni di questi approcci. Le proteine ingegnerizzate sono espresse e prodotte mediante tecniche standard di biologia molecolare.

Con "molecola di acido nucleico isolata o polinucleotide" si intende una molecola di acido nucleico, DNA o RNA, che è stata rimossa dal suo ambiente nativo. Per esempio, un polinucleotide ricombinante che codifica un polipeptide contenuto in un vettore è considerato isolato. Ulteriori esempi di un polinucleotide isolato includono polinucleotidi ricombinanti mantenuti in cellule ospiti eterologhe o polinucleotidi purificati (parzialmente o sostanzialmente) in soluzione. Un polinucleotide isolato include una molecola di polinucleotide contenuta in cellule che ordinariamente contengono la molecola di polinucleotide, tuttavia, la molecola di polinucleotide è presente extracromosomicamente o in una localizzazione cromosomica che è differente dalla sua localizzazione cromosomica naturale. Molecole di RNA isolate includono trascritti di RNA in vivo o in vitro, nonché forme di filamento positivo e negativo e forme a doppio filamento. Polinucleotidi isolati o acidi nucleici descritti nella presente includono inoltre quelle molecole prodotte sinteticamente, per esempio, tramite PCR o sintesi chimica. In aggiunta, in alcune forme di realizzazione, un polinucleotide o un acido nucleico include un elemento regolatore come un attivatore, un sito di legame del ribosoma o un terminatore di trascrizione.

Il termine "reazione a catena della polimerasi" o "PCR" si riferisce in generale a un metodo per l'amplificazione di una sequenza nucleotidica desiderata in vitro, come descritto, per esempio, nel brevetto statunitense n° 4,683,195. In generale, il metodo PCR coinvolge cicli ripetuti di sintesi di estensione del primer, usando primer di oligonucleotide in grado di ibridarsi preferenzialmente a un acido nucleico templato.

Con acido nucleico o polinucleotide avente una sequenza nucleotidica, per esempio, "identica" almeno al 95% con una sequenza nucleotidica di riferimento della presente invenzione, si intende che la sequenza nucleotidica del polinucleotide è identica alla sequenza di riferimento, ad eccezione del fatto che la sequenza polinucleotidica può includere fino a cinque mutazioni puntiformi per ogni 100 nucleotidi della sequenza nucleotidica di riferimento. In altre parole, per ottenere un polinucleotide avente una sequenza nucleotidica identica almeno al 95% con una sequenza nucleotidica di riferimento, fino al 5% dei nucleotidi nella sequenza di riferimento può essere eliminato o sostituito con un altro nucleotide o un certo numero di nucleotidi fino al 5% del totale dei nucleotidi nella sequenza di riferimento può essere inserito nella sequenza di riferimento. Queste alterazioni della sequenza di riferimento possono avvenire nelle posizioni terminali 5' o 3' della sequenza nucleotidica di riferimento o ovunque tra quelle posizioni terminali, intercalate sia singolarmente tra i residui nella sequenza di riferimento sia in uno o più gruppi contigui all'interno della sequenza di riferimento. Come questione pratica, il fatto che una qualsiasi particolare sequenza polinucleotidica è identica almeno all'80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a una sequenza nucleotidica della presente invenzione può essere determinato convenzionalmente usando programmi informatici noti, come quelli esaminati sopra per i polipeptidi (per esempio ALIGN-2).

Un derivato o una variante di un polipeptide è quello/a che condivide "omologia" o è "omologo/a" con il peptide se le sequenze amminoacidiche del derivato o della variante hanno almeno il 50% di identità con una sequenza di 100 amminoacidi dal peptide originale. In alcune forme di realizzazione, il derivato o la variante è uguale almeno al 75% a quello/a del peptide o di un frammento del peptide avente lo stesso numero di residui di amminoacido del derivato. In alcune forme di realizzazione, il derivato o la variante è uguale almeno all'85% a quello/a del peptide o di un frammento del peptide avente lo stesso numero di residui di amminoacido del derivato. In alcune forme di realizzazione, la sequenza amminoacidica del derivato è uguale almeno al 90% a quella del peptide o di un frammento del peptide avente lo stesso numero di residui di amminoacido del derivato. In alcune forme di realizzazione, la sequenza amminoacidica del derivato è uguale almeno al 95% a quella del peptide o di un frammento del peptide avente lo stesso numero di residui di amminoacido del derivato. In alcune forme di realizzazione, il derivato o la variante è uguale almeno al 99% a quello/a del peptide o di un frammento del peptide avente lo stesso numero di residui di amminoacido del derivato.

Il termine "modificato", come usato nella presente, si riferisce a qualsiasi cambiamento apportato a un dato polipeptide, come cambiamenti alla lunghezza del polipeptide, alla sequenza amminoacidica, alla struttura chimica, alla modifica co-traduzionale, o alla modifica post-

traduzionale di un polipeptide. L'espressione forma "(modificata)" indica che i polipeptidi in disamina sono facoltativamente modificati, vale a dire che i polipeptidi in disamina possono essere modificati o non modificati.

In alcuni aspetti, un costrutto legante l'antigene comprende una sequenza amminoacidica che è almeno all'80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% identica a una sequenza amminoacidica rilevante o a un relativo frammento esposto nella/e Tabella/e o numero/i di accesso divulgati nella presente. In alcuni aspetti, un costrutto legante l'antigene isolato comprende una sequenza amminoacidica codificata da un polinucleotide che è almeno all'80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% identica a una sequenza nucleotidica rilevante o relativo frammento esposto nella/e Tabella/e o numero/i di accesso divulgati nella presente.

Le pubblicazioni esaminate nella presente sono fornite esclusivamente per la loro divulgazione prima della data di deposito della presente domanda. Nulla nella presente deve essere interpretato come un'ammissione del fatto che gli inventori non siano autorizzati ad anteporre tale divulgazione in virtù di un'invenzione precedente o per qualsiasi altro motivo.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI:

Bowles JA, Wang SY, Link BK, Allan B, Beuerlein G, Campbell MA, Marquis D, Ondek B, Wooldridge JE, Smith BJ, Breitmeyer JB, Weiner GJ. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood*. 2006 Oct 15;108(8):2648-54. Epub 2006 Jul 6.

Desjarlais JR, Lazar GA. Modulation of antibody effector function. *Exp Cell Res*. 2011 May 15;317(9):1278-85.

Ferrara C, Grau S, Jäger C, Sondermann P, Brünker P, Waldhauer I, Hennig M, Ruf A, Rufer AC, Stihle M, Umaña P, Benz J. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIIIb and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 2;108(31):12669-74.

Heider KH, Kiefer K, Zenz T, Volden M, Stilgenbauer S, Ostermann E, Baum A, Lamche H, Küpcü Z, Jacobi A, Müller S, Hirt U, Adolf GR, Borges E. A novel Fc-engineered monoclonal antibody to CD37 with enhanced ADCC and high proapoptotic activity for treatment of B-cell malignancies. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4159-68. Epub 2011 Jul 27. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4159-68. Epub 2011 Jul 27.

Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 14;103(11):4005-10. Epub 2006 Mar 6.

Lu Y, Vernes JM, Chiang N, Ou Q, Ding J, Adams C, Hong K, Truong BT, Ng D, Shen A, Nakamura G, Gong Q, Presta LG, Beresini M, Kelley B, Lowman H, Wong WL, Meng YG. Identification of IgG(1) variants with increased affinity to FcγRIIIa and unaltered affinity to FcγRI and FcRn: comparison of soluble receptor-based and cell-based binding assays. *J Immunol Methods*. 2011 Feb 28;365(1-2):132-41. Epub 2010 Dec 23.

Mizushima T, Yagi H, Takemoto E, Shibata-Koyama M, Isoda Y, Iida S, Masuda K, Satoh M, Kato K. Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes Cells*. 2011 Nov;16(11):1071-1080.

Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs*. 2010 Mar-Apr;2(2):181-9.

Nordstrom JL, Gorlatov S, Zhang W, Yang Y, Huang L, Burke S, Li H, Ciccarone V, Zhang T, Stavenhagen J, Koenig S, Stewart SJ, Moore PA, Johnson S, Bonvini E. Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fc-gamma receptor binding properties. *Breast Cancer Res*. 2011 Nov 30;13(6):R123. [Epub ahead of print]

Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR. Optimization of antibody binding to Fc-gammaRIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther*. 2008 Aug;7(8):2517-27.

Schneider S, Zacharias M. Atomic resolution model of the antibody Fc interaction with the complement C1q component. *Mol Immunol*. 2012 May;51(1):66-72.

Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6591-604.

Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, Rankin CT, Li H, Burke S, Huang L, Vijn S, Johnson S, Bonvini E, Koenig S. Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fc-gamma receptors. *Cancer Res*. 2007 Sep 15;67(18):8882-90.

Stewart R, Thom G, Levens M, Güler-Gane G, Holgate R, Rudd PM, Webster C, Jermutus L, Lund J. A variant human IgG1-Fc mediates improved ADCC. *Protein Eng Des Sel*. 2011 Sep;24(9):671-8. Epub 2011 May 18.

ESEMPI

Di seguito sono riportati esempi di forme di realizzazione specifiche per realizzare la presente invenzione. Gli esempi sono offerti soltanto a scopo illustrativo. Sono stati compiuti sforzi per garantire la precisione dei numeri usati (per esempio, quantità, temperature, eccetera), ma naturalmente devono essere presi in considerazione errori e deviazioni sperimentali.

La concretizzazione della presente invenzione impiegherà, a meno che non sia indicato in altro modo, metodi convenzionali di chimica delle proteine, biochimica, tecniche di DNA ricombinante e farmacologia all'interno delle competenze della tecnica. Tali tecniche sono ampiamente illustrate nella letteratura. Si vedano, per esempio, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., integrazione attuale); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2a Edizione, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick e N. Kaplan ed., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18a Edizione (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey e Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3a Ed.* (Plenum Press) Vol. A e B(1992).

Il costruito legante l'antigene secondo l'invenzione è esemplificato negli Esempi di seguito dal costruito "v7091" e dal costruito "v10000". Riferimenti ad altri costrutti che ricadono all'esterno dell'ambito della rivendicazione sono destinati al riferimento e all'illustrazione e non fanno parte dell'invenzione rivendicata.

Esempio 1: Preparazione di anticorpi bispecifici Anti-HER2 e controlli esemplificativi

Un numero di anticorpi biparatopici anti-HER2 (o costrutti leganti l'antigene) e controlli esemplificativi sono stati preparati come descritto di seguito. Gli anticorpi e i controlli sono stati preparati in formati differenti e nella Figura 1 sono mostrate rappresentazioni di formati biparatopici esemplificativi. In tutti i formati mostrati nella Figura 1, l'Fc eterodimerico è rappresentato con una catena (Catena A) mostrata in nero e l'altra (Catena B) mostrata in grigio, mentre un dominio legante l'antigene (1) è mostrato con riempimento tratteggiato, mentre l'altro dominio legante l'antigene (2) è mostrato in bianco.

La Figura 1A rappresenta la struttura di un anticorpo biparatopico in un formato Fab-Fab. Le Figure da 1B a 1E rappresentano la struttura di possibili versioni di un anticorpo biparatopico in un formato scFv-Fab. Nella Figura 1B, il dominio legante l'antigene 1 è uno scFv, fuso alla Catena A, mentre il dominio legante l'antigene 2 è un Fab, fuso alla Catena B. Nella Figura 1C, il dominio legante l'antigene 1 è un Fab, fuso alla Catena A, mentre il dominio legante l'antigene 2 è uno scFv, fuso alla Catena B. Nella Figura 1D, il dominio legante l'antigene 2 è un Fab, fuso alla Catena A, mentre il dominio legante l'antigene 1 è uno scFv, fuso alla Catena B. Nella Figura 1E, il dominio legante l'antigene 2 è uno scFv, fuso alla Catena A, mentre il dominio legante l'antigene 1 è un Fab, fuso alla Catena B. Nella Figura 1F, entrambi i domini leganti l'antigene sono scFv.

Le sequenze delle seguenti varianti sono fornite nella Tabella delle sequenze presente dopo gli Esempi. Le regioni CDR sono state identificate usando una combinazione dei metodi di Kabat e Chothia. Le regioni possono variare leggermente in base al metodo usato per l'identificazione.

Anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi

Gli anticorpi biparatopici anti-HER2 sono stati preparati come mostrato nella Tabella 1, in cui v7091 e v10000 esemplificano l'invenzione.

Tabella 1: Anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi

Variante		Catena A	Catena B
5019	dominio contenente l'epitopo	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	scFv
	Nome dell' anticorpo	Pertuzumab	Trastuzumab
	Sostituzioni di sequenza CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T366I_N390R_K392M_T394W
5020	dominio contenente l'epitopo	ECD4	ECD2
	formato	scFv	Fab
	Nome dell' anticorpo	Trastuzumab	Pertuzumab
	Sostituzioni di sequenza CH3	L351Y_S400E_F405A_Y405V	T3 50V_T366L_K392L_T3 94W
7091	dominio contenente l'epitopo	ECD2	ECD4
	formato	Fab	scFv
	Nome dell' anticorpo	Pertuzumab	Trastuzumab
	Sostituzioni di sequenza CH3	T350V_L351Y_F405A_Y405V	T3 50V_T366L_K392L_T394W
10000	dominio contenente l'epitopo	ECD2	ECD4
	formato	Fab	scFv
	Nome dell' anticorpo	Pertuzumab - con Y96A nella regione VL e T30A/A49G/L69F nella regione VH	Trastuzumab
	Sostituzioni di sequenza CH3	T350V_L351Y_F405A_Y405V	T350V_T366L_K392L_T394W
6902	dominio contenente l'epitopo	ECD2	ECD4
	formato	Fab	Fab
	Nome dell' anticorpo	Trastuzumab	Pertuzumab
	Sostituzioni Fab	HC: L143E_K145T LC: Q124R	HC: D146G_Q179K LC: Q124E_Q160E_T180E
	Sostituzioni di sequenza CH3	T350V_L351Y_F405A_Y405V	T350V_T366L_K392L_T394W
6903	dominio contenente l'epitopo	ECD2	ECD4
	formato	Fab	Fab
	Sostituzioni Fab	HC: L143E_K145T LC: Q124R_Q1160K_T178R	HC: D146G_Q179K LC: Q124E_Q160E_T180E
	Nome dell' anticorpo	Trastuzumab	Pertuzumab
	Sostituzioni di sequenza	T350V_L351Y_F405A_Y405V	T350V_T366L_K392L_T394W

	CH3		
6717	dominio contenente l'epitopo	ECD4	ECD2
	formato	scFv	scFv
	Nome dell' anticorpo	Pertuzumab	Trastuzumab
	Sostituzioni di sequenza CH3	T350V_L351Y_F405A_Y405V	T366I_N390R_K392M_T394W

Note:

- Numerazione CH3 secondo EU; numerazione Fab o dominio variabile secondo Kabat;
- "dominio contenente l'epitopo" = dominio di HER2 a cui si lega la frazione legante l'antigene;
- "Nome dell' anticorpo" = anticorpo da cui deriva la frazione legante l'antigene, include sostituzioni confrontate con il wild-type quando

presente;

- "Sostituzioni Fab" = sostituzioni in Fab che favoriscono l'accoppiamento corretto della catena leggera;

"Sostituzioni di sequenza CH3" = sostituzioni nel dominio CH3 che favoriscono la formazione di Fc eterodimerico

Anticorpi di controllo monovalenti anti-HER2 esemplificativi

v1040: un anticorpo anti-HER2 monovalente, in cui il dominio di legame HER2 è un Fab ricavato da trastuzumab sulla catena A e la regione Fc è un eterodimero avente le mutazioni T350V_L351Y_F405A_Y407V nella Catena A, T350V_T366L_K392L_T394W nella Catena B, e la regione cerniera della Catena B avente la mutazione C226S; il dominio legante l'antigene si lega al dominio 4 di HER2.

v630 - un anticorpo anti-HER2 monovalente, in cui il dominio di legame a HER2 è un scFv ricavato da trastuzumab sulla Catena A e la regione Fc è un eterodimero avente le mutazioni L351Y_S400E_F405A_Y407V nella Catena A, T366I_N390R_K392M_T394W nella Catena B; e la regione cerniera avente la mutazione C226S (numerazione EU) in entrambe le catene; il dominio legante l'antigene si lega al dominio 4 di HER2.

v4182: un anticorpo anti-HER2 monovalente, in cui il dominio di legame a HER2 è un Fab derivato da pertuzumab sulla catena A e la regione Fc è un eterodimero avente le mutazioni T350V_L351Y_F405A_Y407V nella Catena A, T350V_T366L_K392L_T394W nella Catena B, e la regione cerniera della Catena B avente la mutazione C226S; il dominio legante l'antigene si lega al dominio 2 di HER2.

Controlli di anticorpi bivalenti monospecifici anti-HER2 (anticorpi a grandezza intera, FSA) esemplificativi

v506 è un anti-HER2 wild-type prodotto internamente in cellule di ovaio di criceto cinese (CHO) come controllo. Entrambi i domini di legame a HER2 derivano da trastuzumab nel formato Fab e Fc è un omodimero wild-type; il dominio legante l'antigene si lega al dominio 4 di HER2.

Questo anticorpo è anche denominato analogo di trastuzumab.

v792, è trastuzumab wild-type con una cerniera di IgG1, in cui entrambi i domini di legame a HER2 derivano da trastuzumab nel formato Fab e la regione Fc è un eterodimero avente le mutazioni T350V_L351Y_F405A_Y407V nella Catena A e T350V_T366L_K392L_T394W nella Catena B; il dominio legante l'antigene si lega al dominio 4 di HER2. Questo anticorpo è anche denominato analogo di trastuzumab.

v4184, un anticorpo anti-HER2 bivalente, in cui entrambi i domini di legame a HER2 derivano da pertuzumab nel formato Fab, e la regione Fc è un eterodimero avente le mutazioni T350V_L351Y_F405A_Y407V nella Catena A e T350V_T366L_K392L_T394W nella Catena B. Il dominio legante l'antigene si lega al dominio 2 di HER2. Questo anticorpo è anche denominato analogo di pertuzumab.

hIgG è un controllo di anticorpo policlonale non specifico commerciale (Jackson ImmunoResearch, # 009-000-003).

Questi anticorpi e controlli (diversi dall'IgG umana) sono stati clonati ed espressi come segue. I geni che codificano le catene pesanti e leggere dell'anticorpo sono stati realizzati tramite sintesi genica usando codoni ottimizzati per l'espressione umana/mammifera. La sequenza Fab di Trastuzumab è stata generata da un anticorpo di legame del dominio 4 di HER2/neu noto ((Carter P. et al. (1992) Humanization of an anti p185 HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci* 89, 4285.) Inoltre, l'Fc era un isotipo di IgG1. La sequenza di scFv è stata generata dai domini VH e VL di Trastuzumab usando un linker glicina-serina (Carter P. et al. (1992) Humanization of an anti p 185 her2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci* 89, 4285). La sequenza Fab di Pertuzumab è stata generata da un Ab di legame del dominio 2 di HER2/neu noto (Adams CW et al. (2006) Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic her dimerization inhibitor, Pertuzumab. Cancer Immunol Immunother. 2006;55(6):717-27).

I prodotti genici finali sono stati subclonati nel vettore di espressione di mammifero PTT5 (NRC-BRI, Canada) ed espressi in cellule CHO (Durocher, Y., Perret, S. & Kamen, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing CHO cells. *Nucleic acids research* 30, e9 (2002)).

Le cellule CHO sono state trasfettate in fase di crescita esponenziale (da 1,5 a 2 milioni di cellule/ml) con 1 mg/ml acquoso di polietilenimina 25 kDa (PEI, polysciences) con un rapporto PEI:DNA di 2,5:1.(Raymond C. et al. A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications. *Methods.* 55(1):44-51 (2011)). Per determinare l'intervallo di concentrazione ottimale per la formazione di eterodimeri, il DNA è stato trasfettato in rapporti di DNA ottimali della catena pesante A (HC-A), catena leggera (LC) e catena pesante B (HC-B) che consentono la formazione di eterodimeri (per esempio, rapporti HC-A/HC-B/LC = 30:30:40 (v5019)). Le cellule trasfettate sono state raccolte dopo 5-6 giorni con il terreno di coltura raccolto dopo centrifugazione a 4000 giri al minuto e chiarificato usando un filtro da 0,45 µm.

Il terreno di coltura chiarificato è stato caricato su una colonna di proteina-A MabSelect SuRe (GE Healthcare) e lavato con 10 volumi di colonna di tampone PBS a pH 7,2. L'anticorpo è stato eluito con 10 volumi di colonna di tampone citrato a pH 3,6, con le frazioni raggruppate contenenti l'anticorpo neutralizzate con TRIS a pH 11.

L'eluato di anticorpo proteina-A è stato inoltre purificato mediante filtrazione su gel (SEC). Per la filtrazione su gel, 3,5 mg della miscela di anticorpo sono stati concentrati a 1,5 ml e caricati su una colonna Sephadex 200 HiLoad 16/600 200 pg (GE Healthcare) tramite un AKTA Express FPLC a una portata di 1 ml/min. Il tampone di PBS a pH 7,4 è stato usato a una portata di 1 ml/min. Le frazioni corrispondenti all'anticorpo purificato sono state raccolte e concentrate a ~1 mg/ml.

Anticorpi biparatopici anti-HER2 ECD2 x ECD4 esemplificativi con differenti formati molecolari (per esempio v6717, scFv-scFv IgG1; v6903 e v6902 Fab-Fab IgG1; v5019, v7091 e v10000 Fab-scFv IgG1) sono stati clonati, espressi e purificati come descritto sopra.

Per quantificare la purezza dell'anticorpo e determinare la quantità di proteina eterodimera target ed eventuale omodimero e/o mezzo-anticorpo e/o contaminante di catena leggera mal accoppiato, è stata eseguita un'analisi di massa intatta LC-MS. L'analisi di massa intatta LC-MS è stata eseguita come descritto nell'Esempio 2, escludendo i calcoli dell'analisi DAR usati per le molecole ADC.

I dati sono mostrati nella Tabella 2. La Tabella 2 mostra che l'espressione e la purificazione di questi anticorpi biparatopici hanno avuto come risultato il 100% del prodotto desiderato per v6717, il 91% del prodotto eterodimerico desiderato per v6903 e il 62% del prodotto desiderato per v6902. I numeri tra parentesi indicano le quantità del picco principale più un picco laterale di + 81 Da. Tipicamente, questo picco laterale è rilevato con varianti che contengono tag HA C-terminali (come v6903 e v6902). Aggiungendo i picchi principali e laterali si ottengono purezze eterodimeriche approssimativamente del 98% e del 67% per v6903 e v6903. In base all'elevata purezza eterodimerica, v6903 è stato identificato come la variante biparatopica anti-HER2 Fab-Fab rappresentativa per il confronto diretto con i formati scFv-scFv e Fab-scFv. v6903 è stato incluso in tutti i saggi di confronto dei formati.

Tabella 2: Espressione e purificazione di anticorpi

Variante	Specie di eterodimero desiderato (+picco laterale)
6717	100.0
6903	90.9 (97.7)
6902	62.4 (67.4)

Esempio 2: Preparazione di coniugati farmaco-anticorpo (ADC) biparatopici anti-HER2 esemplificativi

Sono stati preparati i seguenti coniugati farmaco-anticorpo biparatopici anti-HER2 (ADC biparatopici anti-HER2). Gli ADC delle varianti 5019, 7091, 10000 e 506 sono stati preparati. Questi ADC sono identificati come segue, in cui v7091 e v10000 esemplificano l'invenzione:

v6363 (v5019 coniugato a DM1)

v7148 (v7091 coniugato a DM1)

v10553 (v10000 coniugato a DM1)

v6246 (v506 coniugato a DM1, analogo a T-DM1, trastuzumab-emtansine)

v6249 (IgG umana coniugata a DM1)

Gli ADC sono stati preparati tramite accoppiamento diretto a maitansina. Anticorpi purificati mediante Proteina A e SEC, come descritto nell'Esempio 1 (>95% di purezza), sono stati usati nella preparazione delle molecole di ADC. Gli ADC sono stati coniugati seguendo il metodo descritto in Kovtun YV, Audette CA, Ye Y, et al. Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen. Cancer Res 2006;66:3214-21. Gli ADC avevano un rapporto molare medio di 3,0 molecole maitansinoidi per anticorpo, come determinato mediante LC/MS e descritto di seguito.

I dettagli dei reagenti usati nella reazione di coniugazione degli ADC sono i seguenti: Tampone di coniugazione 1: 50 mM di Fosfato di Potassio/50 mM di Cloruro di Sodio, pH 6,5, 2 mM di EDTA. Tampone di coniugazione 2: 50 mM di Succinato di Sodio, pH 5,0. Tampone di formulazione di ADC: 20 mM di Succinato di Sodio, 6% (p/v) di Trealosio, 0,02% di polisorbato 20, pH 5,0. Dimetilacetammide (DMA); 10 mM di SMCC in DMA (preparato prima della coniugazione), 10 mM di DM1-SH in DMA (preparato prima della coniugazione), 1 mM di DTNB in PBS, 1 mM di cisteina in tampone, 20 mM di Succinato di Sodio, pH 5,0. Spettrofotometro UV-VIS (Nano drop 100 di Fisher Scientific), colonne PD-10 (GE Healthcare).

Gli ADC sono stati preparati come segue. La soluzione di anticorpo iniziale è stata caricata sulla colonna PD-10, precedentemente equilibrata con 25 ml di tampone di coniugazione 1, seguito da 0,5 ml di tampone di coniugazione 1. L'eluato di anticorpo è stato raccolto e la concentrazione misurata a A_{280} e la concentrazione è stata regolata a 20 mg/ml. Sono stati preparati 10 mM di soluzione di SMCC-DM1 in DMA. Un equivalente molare di 7,5 di SMCC-DM1 rispetto all'anticorpo è stato aggiunto alla soluzione di anticorpo e DMA è stata aggiunta fino a un volume finale di DMA del 10% v/v. La reazione è stata brevemente miscelata e incubata a RT per 2 ore. Una seconda colonna PD-10 è stata equilibrata con 25 ml di tampone di coniugazione 1 e la soluzione di anticorpo-MCC-DM1 è stata aggiunta alla colonna seguita da 0,5 ml di tampone 1. L'eluato di anticorpo-MCC-DM1 è stato raccolto e A_{252} e A_{280} della soluzione di anticorpo sono stati misurati. La concentrazione di anticorpo-MCC-DM1 è stata

calcolata ($\square=1,45 \text{ mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o $217500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Gli ADC sono stati analizzati su una colonna SEC-HPLC per l'analisi ad alto peso molecolare (colonna SEC-HPLC TOSOH, G3000-SWXL, 7,8 mm x 30 cm, tampone, 100 mM di fosfato di sodio, 300 mM di cloruro di sodio, pH 7,0, flusso: 1 ml/min).

Il rapporto farmaco/anticorpo (DAR) degli ADC è stato analizzato mediante HIC-HPLC usando la colonna Tosoh TSK gel Butyl-NPR (4,6 mm x 3,5 mm x 2,5 mm). L'eluizione è stata eseguita a 1 ml/min usando un gradiente di tampone B al 10-90% nell'arco di 25 min, seguito da tampone B al 100% per 4 min. Il tampone A comprende 20 mM di fosfato di sodio, 1,5 M di solfato di ammonio, pH 7,0. Il tampone B comprende 20 mM di fosfato di sodio, 25% v/v di isopropanolo, pH 7,0.

Il rapporto farmaco/anticorpo (DAR) degli ADC è stato determinato mediante LC-MS mediante il seguente metodo. Gli anticorpi sono stati deglicosilati con PNGase F prima del carico su LC-MS. La cromatografia liquida è stata eseguita su un Agilent 1100 Series HPLC alle seguenti condizioni:

Portata: 1 ml/min separato dopo la colonna in 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ a MS. Solventi: A = 0,1% di acido formico in ddH₂O, B = 65% di acetonitrile, 25% di THF, 9,9% di ddH₂O, 0,1% di acido formico. Colonna: 2,1 x 30 mm PorosR2. Temperatura della colonna: 80 °C ; solvente anche preriscaldato. Gradiente: 20% B (0-3min), 20-90% B (3-6min), 90-20% B (6-7min), 20% B (7-9min).

Successivamente, è stata eseguita una spettrometria di massa (MS) su uno spettrometro di massa LTQ-Orbitrap XL alle seguenti condizioni: Metodo di ionizzazione usando Ion Max Electrospray. Metodo di calibrazione e taratura: una soluzione di 2 mg/ml di CsI è infusa con una portata di 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. L'Orbitrap è stato tarato su m/z 2211 usando la funzionalità di Taratura Automatica (intervallo globale di ioni CsI osservato: da 1690 a 2800). Tensione di Cono: 40V; Lente del Tubo: 115V; Risoluzione FT: 7.500; Intervallo di scansione m/z 400-4000; Ritardo di scansione: 1,5 min. Un profilo di peso molecolare dei dati è stato generato usando il software di deconvoluzione Promass di Thermo. Il DAR medio del campione è stato determinato come funzione del DAR osservato in corrispondenza di ciascun picco frazionale (usando il calcolo: $\Sigma (\text{DAR} \times \text{intensità di picco frazionale})$).

La Tabella 3 riassume il DAR medio per le molecole ADC. Il DAR medio per l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo e il controllo era approssimativamente 3.

Tabella 3: DAR medio per ADC

	DAR (LC-MS)	DAR (HIC)	n
v6246	2.9	3.0	5
v6363	2.6	3.3	5
v7148	3.4	3.9	1
v10553	4.0	4.0	1

Esempio 3: Espressione e purificazione su bilancia da banco di anticorpo biparatopico anti-HER2

Gli anticorpi biparatopici anti-HER2 (v5019, v7091 e v10000) descritti nell'Esempio 1 sono stati espressi in volumi di 10 e/o 25 L e purificati mediante proteina A e cromatografia di esclusione dimensionale (SEC) come segue.

Il terreno di coltura chiarificato è stato caricato su una colonna di proteina-A MabSelect SuRe (GE Healthcare) e lavato con 10 volumi di colonna di tampone PBS a pH 7,2. L'anticorpo è stato eluito con 10 volumi di colonna di tampone citrato a pH 3,6, con le frazioni raggruppate contenenti l'anticorpo neutralizzate con Tris a pH 11.

L'eluato di anticorpo proteina-A è stato inoltre purificato mediante filtrazione su gel (SEC). Per la filtrazione su gel, 3,5 mg della miscela di anticorpo sono stati concentrati a 1,5 ml e caricati su una colonna Sephadex 200 HiLoad 16/600 200 pg (GE Healthcare) tramite un AKTA Express FPLC a una portata di 1 ml/min. Il tampone di PBS a pH 7,4 è stato usato a una portata di 1 ml/min. Le frazioni corrispondenti all'anticorpo purificato sono state raccolte e concentrate a ~1 mg/ml. Le proteine purificate sono state analizzate mediante LC-MS come descritto nell'Esempio 2.

I risultati dell'espressione 10L e della purificazione di proteina A su bilancia da banco e SEC sono mostrati nella Figura 2A e 2B. La Figura 2A mostra il cromatogramma SEC di v5019 purificato con proteina A e la Figura 2B mostra il gel SDS-PAGE non riducente che confronta la purezza relativa di una frazione di proteina A raggruppata nonché le frazioni SEC 15 e 19 e le frazioni SEC raggruppate 16-18. Questi risultati mostrano che è stato espresso l'anticorpo biparatopico anti-HER2 e che la purificazione mediante proteina A e SEC ha prodotto un campione di proteina pura. Un'ulteriore quantificazione è stata eseguita mediante analisi UPLC-SEC e LC-MS ed è descritta nell'Esempio 4.

I risultati dell'espressione 25 L e della purificazione mediante proteina A su bilancia da banco sono mostrati nella Figura 2C. La Figura 2C mostra il gel SDS-PAGE che confronta la purezza relativa di v10000 purificato con proteina A. La riga M contiene: marcatore di proteina; la riga 1 contiene: v10000 in condizioni riducenti; la riga 2 contiene v10000 in condizioni non riducenti. Il gel SDS-PAGE mostra che v10000 è puro e migra al corretto MW previsto di approssimativamente 125 kDa in condizioni non riducenti. In condizioni riducenti, sono visibili due bande di catene pesanti corrispondenti alla catena pesante CH-A (approssimativamente 49 kDa) e alla catena pesante CH-B (approssimativamente 52,5 kDa); la catena leggera CH-A è visibile e migra alla corretta massa prevista di approssimativamente 23,5 kDa. Questi risultati mostrano che è stato espresso l'anticorpo biparatopico anti-HER2 e che la purificazione a una fase mediante proteina A ha prodotto un campione di proteina pura. Un'ulteriore quantificazione è stata eseguita mediante analisi UPLC-SEC e LC-MS ed è descritta nell'Esempio 4.

Esempio 4: Analisi di purezza di anticorpo biparatopico anti-HER2 mediante UPLC-SEC e LC-MS

La purezza e l'aggregazione percentuale della proteina A esemplificativa e degli eteromultimeri anti-HER2 biparatopici purificati mediante SEC sono state determinate mediante UPLC-SEC mediante il metodo descritto.

L'analisi UPLC-SEC è stata eseguita usando una colonna Waters BEH200 SEC impostata a 30 °C (2,5 ml, 4,6 × 150 mm, acciaio inossidabile, particelle da 1,7 µm) a 0,4 ml/min. I tempi di esecuzione erano 7 min e un volume totale per iniezione di 2,8 ml con tamponi di esecuzione di 25 mM di fosfato di sodio, 150 mM di acetato di sodio, pH 7,1; e 150 mM di fosfato di sodio, pH 6,4-7,1. Il rilevamento mediante assorbanza è stato agevolato a 190-400 nm e mediante fluorescenza con eccitazione a 280 nm ed emissione raccolta da 300-360 nm. L'integrazione di picco è stata analizzata mediante il software Empower 3.

I risultati UPLC-SEC delle frazioni SEC v5019 raggruppate sono mostrati nella Figura 3A. Questi risultati indicano che l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo è stato purificato a una purezza superiore al 99% con meno dell'1% di specie HMW mediante proteina A e cromatografia SEC.

I risultati UPLC-SEC delle frazioni di Proteina A raggruppate v10000 sono mostrati nella Figura 3B. Questi risultati indicano che l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo è stato purificato a una purezza superiore al 96% con meno dell'1% di specie HMW mediante cromatografia su proteina A.

La purezza degli anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi è stata determinata mediante LC-MS in condizioni standard mediante il metodo descritto nell'Esempio 2. I risultati dell'analisi LC-MS delle frazioni SEC raggruppate di v5019 sono mostrati nella Figura 4A. Questi dati mostrano che l'eterodimero biparatopico anti-HER2 esemplificativo ha una purezza di eterodimero del 100%. I risultati dell'analisi LC-MS delle frazioni di proteina A raggruppate di v10000 sono mostrati nella Figura 4B. Questi dati mostrano che l'eterodimero anti-HER2 biparatopico esemplificativo ha una purezza di eterodimero del 98% dopo una purificazione della proteina A a una fase.

Anticorpi purificati mediante cromatografia su proteina A e/o proteina A e SEC sono stati usati per i saggi descritti negli Esempi che seguono.

Esempio 5. Valutazione di espressione su larga scala e producibilità di anticorpo anti-HER2 biparatopico purificato mediante cromatografia su proteina A e CEX

L'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo v5019 descritto nell'Esempio 1 è stato espresso su una scala 25 L e purificato come segue.

L'anticorpo è stato ottenuto dal surnatante, seguito da un metodo di purificazione in due fasi che consisteva nella purificazione mediante

proteina A (resina MabSelect™; GE Healthcare) seguita da cromatografia a scambio cationico (resina SP FF HiTrap™; GE Healthcare) mediante il protocollo descritto.

Le cellule CHO-3E7 sono state mantenute in un terreno di espressione Freestyle CHO privo di siero (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in beute Erlenmeyer a 37 °C con CO2 al 5% (Corning Inc., Acton, MA) su un agitatore orbitale (VWR Scientific, Chester, PA). Due giorni prima della trasfezione, le cellule sono state seminate a una densità appropriata in CellBag da 50 l con un volume di 25 l usando Wave Bioreactor System 20/50 (GE Healthcare Bio-Science Corp). Il giorno della trasfezione, DNA e PEI (Polysciences, Eppelheim, Germania) sono stati miscelati con un rapporto ottimale e aggiunti alle cellule usando il metodo descritto nell'Esempio 1. I surnatanti delle cellule raccolti il giorno 6 sono stati usati per l'ulteriore purificazione.

Il brodo di coltura cellulare è stato centrifugato e filtrato prima del carico su 30 ml di resina Mabselect™ confezionata in XK26/20 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) a 10,0 ml/min. Dopo il lavaggio e l'eluizione con tampone appropriato, le frazioni sono state raccolte e neutralizzate con 1 M di Tris-HCl, a pH 9,0. La proteina target è stata ulteriormente purificata tramite 20 ml di resina SP FF confezionata in XK16/20 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Il campione purificato MabSelect™ è stato diluito con 20 mM di NaAC, pH 5,5 per regolare la conduttività a < 5 ms/cm e sono stati aggiunti 50 mM di acido citrico (pH 3,0) per regolare il valore di pH del campione a 5,5. Il campione è stato caricato a 1 ml/min sulla resina SP FF HiTrap™ (GE Healthcare) e lavato con 20 mM di NaAC. La proteina è stata eluita usando un'eluizione di gradiente 0-100% di 20 mM di NaAC, 1 M di NaCl, a pH 5,5, 10 CV a 1 ml/min.

La proteina purificata è stata analizzata mediante SDS-PAGE, come descritto nell'esempio 1, e LC-MS per la purezza dell'eterodimero mediante il metodo descritto nell'esempio 4. I risultati sono mostrati nella Figura 5A e 5B. La Figura 5A mostra i risultati di SDS-PAGE di v5019 dopo la purificazione con SP FF MabSelect™ e HiTrap™; la riga M contiene: marcatore proteico; riga 1: v5019 in condizioni riducenti (3 µg); riga 2: v5019 in condizioni non riducenti (2,5 µg). Il gel SDS-PAGE mostra che v5019 è relativamente puro dopo la purificazione con SP FF MabSelect™ e HiTrap™ in condizioni non riducenti, migra al corretto MW previsto di approssimativamente 125 kDa. In condizioni riducenti, sono visibili due bande di catene pesanti corrispondenti alla catena pesante CH-A (approssimativamente 49 kDa) e alla catena pesante CH-B (approssimativamente 52,5 kDa); la catena leggera CH-A è visibile e migra alla corretta massa prevista di approssimativamente 23,5 kDa.

L'analisi LC-MS di v5019 purificato con SP FF MabSelect™ e HiTrap™ è stata eseguita per determinare la purezza dell'eterodimero usando il metodo descritto nell'Esempio 4. I risultati dell'analisi LC-MS sono mostrati nella Figura 5B. Questi risultati mostrano che la purificazione di v5019 usando SP FF MabSelect™ e HiTrap™ produce una proteina con una purezza dell'eterodimero superiore al 99% e con una contaminazione

di omodimero o mezzo anticorpo minima (<1%) o non rilevabile.

Esempio 6: Confronto di B_{max} di un anticorpo anti-HER2 biparatopico rispetto a B_{max} di controlli in linee cellulari che esprimono livelli di HER2 da bassi ad alti

L'esperimento seguente è stato eseguito per misurare la capacità di un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo di legarsi a cellule che esprimono livelli variabili di HER2 rispetto ai controlli. Le linee cellulari usate erano SKOV3 (HER2 2+/3+), JIMT-1 (HER2 2+), MDA-MB-231 (HER2 0/1+) e MCF7 (HER2 1+). Gli anticorpi anti-HER2 biparatopici testati includono v5019, v7091 e v10000. La capacità degli anticorpi anti-HER2 biparatopici di legarsi alle cellule che esprimono HER2 (HER2+) è stata determinata come descritto di seguito, con misurazione specifica di B_{max} e K_D apparente (costante di dissociazione all'equilibrio).

Il legame degli anticorpi di test alla superficie delle cellule HER2+ è stato determinato mediante citometria a flusso. Le cellule sono state lavate con PBS e risospese in DMEM a 1×10⁵ cellule/ 100 µl. 100 µl di sospensione cellulare sono stati aggiunti in ciascun tubo di microcentrifuga, seguito da 10 µl/tubo delle varianti di anticorpo. I tubi sono stati incubati per 2 ore a 4 °C su un rotatore. I tubi di microcentrifuga sono stati centrifugati per 2 min a 2000 giri al minuto a temperatura ambiente e i pellet cellulari lavati con 500 µl di terreno. Ogni pellet cellulare è stato risospeso in 100 µl di anticorpo secondario marcato con fluorocromo, diluito in terreni a 2 µg/campione. In seguito, i campioni sono stati incubati per 1 ora a 4 °C su un rotatore. Dopo l'incubazione, le cellule sono state centrifugate per 2 min a 2000 giri al minuto e lavate in terreni. Le cellule sono state risospese in 500 µl di terreno, filtrate in un tubo contenente 5 µl di ioduro di propidio (PI) e analizzate su un citometro a flusso BD LSR II secondo le istruzioni del produttore. La K_D dell'anticorpo eterodimero anti-HER2 biparatopico esemplificativo e degli anticorpi di controllo sono state valutate mediante FACS con analisi dei dati e adattamento della curva eseguiti in GraphPad Prism.

I risultati sono mostrati nelle Figure 6A-6G. Questi risultati dimostrano che gli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi (v5019, v7091 e v10000) possono legarsi alle cellule HER2+ con un B_{max} approssimativamente 1,5 volte superiore rispetto a un FSA anti-HER2 (v506). I risultati nelle Figure 6A-6G mostrano inoltre che gli anticorpi anti-HER2 biparatopici (v5019, v7091 e v10000) possono legarsi alle cellule HER2+ con un B_{max} simile rispetto a una combinazione di due FSA anti-HER2 (v506 + v4184).

I risultati del legame per le cellule SKOV3 HER2+ (HER2 2/3+) sono mostrati nelle Figure 6A, 6E e nella Tabella 4 e nella Tabella 5. I risultati nella Figura 6A e nella Tabella 4 mostrano che l'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v5019) presenta un B_{max} approssimativamente 1,5 volte superiore nel legame alle cellule SKOV3 rispetto a due FSA anti-HER2 differenti (v506 o v4184). I risultati mostrano anche che l'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v5019) presenta un B_{max} equivalente rispetto alla combinazione di due FSA anti-

HER2 (v506 + v4184). La K_D apparente di v5019 per il legame alle SKOV3 era approssimativamente da 2 a 4 volte superiore rispetto ad anti-HER2 FSA da solo (v506 o v4184) o alla combinazione di due FSA anti-HER2 (v506 + v4184).

Tabella 4: Legame alle cellule SKOV3

Variante di anticorpo	K_D (nM)	Bmax
v506	2.713	29190
v4184	4.108	29204
v5019	8.084	47401
v506 + v4184	4.414	49062

I risultati nella Figura 6E e nella Tabella 5 mostrano che gli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi (v5019, 7091 e v10000) mostrano approssimativamente un Bmax da 1,5 a 1,6 volte superiore nel legame alle cellule SKOV3 rispetto a due FSA anti-HER2 differenti (v506 o v4184). I risultati inoltre mostrano che gli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi (v5019, 7091 e v10000) mostrano un Bmax equivalente rispetto alla combinazione di due FSA anti-HER2 (v506 + v4184). La K_D apparente di v5019, v7091, v10000 e della combinazione di due FSA anti-HER2 (v506 + v4184) per il legame a SKOV3 era approssimativamente da 2 a 3 volte superiore rispetto a ciascun FSA anti-HER2 da solo (v506 o v4184).

Tabella 5: Legame a SKOV3

Variante di anticorpo	K_D (nM)	Bmax
v506	4.8	30007
v4184	5.6	27628
v506 + v4184	10.0	49014
v5019	13.6	47693
v7091	74.5	44737
v10000	10.3	48054

Le curve di legame nella linea cellulare JIMT-1 (HER2 2+) sono mostrate nella Figura 6B e nella Tabella 6. Questi risultati illustrano che l'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v5019) mostra approssimativamente un Bmax 1,5 volte superiore nel legame alle cellule JIMT-1 rispetto a un FSA anti-HER2 (v506). I risultati mostrano anche che l'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v5019) presenta un Bmax equivalente rispetto alla combinazione di due FSA anti-HER2 (v506 + v4184). La K_D apparente di v5019 per il legame a JIMT-1 era approssimativamente 2 volte superiore rispetto a FSA anti-HER2 (v506) ed era simile (approssimativamente 1,2 volte maggiore) rispetto alla combinazione di due FSA anti-HER2 (v506 + v4184).

Tabella 6: Legame alle cellule JIMT-1

Variante di anticorpo	K _D (nM)	Bmax
v506	1.875	4905
v5019	4.317	7203
v506 + v4184	5.057	7200

Le curve di legame nella linea cellulare MCF7 (HER2 1+) sono mostrate nella Figura 6C, 6F e nelle Tabelle 7 e 8. Questi risultati mostrano che gli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi (v5019, 7091 e v10000) mostrano approssimativamente un Bmax 1,5 volte superiore nel legame alle cellule MCF7 rispetto a un FSA anti-HER2 (v506). I risultati nella Figura 6C mostrano anche che l'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v5019) mostra un Bmax equivalente rispetto alla combinazione di due FSA anti-HER2 (v506 + v4184). La K_D apparente di v5019 per il legame a MCF7 era simile a FSA anti-HER2 (v506) e alla combinazione di due anti-FSA HER2 (v506 + v4184).

Tabella 7: Legame alle cellule MCF7

Variante di anticorpo	K _D (nM)	Bmax
v506	1.301	542
v5019	1.506	872
v506 + v4184	2.095	903

I risultati nella Figura 6F e nella Tabella 8 mostrano che gli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi (v5019, v7091 e v10000) mostrano un Bmax approssimativamente da 1,6 a 1,7 volte maggiore rispetto a FSA monospecifico v506. La K_D apparente di v5019, v7091 e v10000 era simile a FSA anti-HER2 (v506).

Tabella 8: Legame alle cellule MCF7

Variante di anticorpo	K _D (nM)	Bmax
v506	3.5	571
v5019	5.6	968
v7091	6.5	918
v10000	3.7	915

Le curve di legame nella linea cellulare MDA-MB-231 (HER2 0/1+) sono mostrate nella Figura 6D e nella Tabella 9. Questi risultati illustrano che l'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v5019) mostra approssimativamente un Bmax 1,5 volte superiore nel legame alle cellule MDA-MB-231 rispetto a un FSA anti-HER2 (v506). I risultati mostrano anche che l'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v5019)

presenta un Bmax equivalente rispetto alla combinazione di due FSA anti-HER2 (v506 + v4184). La K_D apparente di v5019 per il legame a MDA-MB-231 era approssimativamente 2,4 volte inferiore rispetto a FSA anti-HER2 (v506) ed era approssimativamente 1,7 volte superiore rispetto alla combinazione di due FSA anti-HER2 (v506 + v4184).

Tabella 9: Legame alle cellule MDA-MB-231

Variante di anticorpo	K_D (nM)	Bmax
v506	8.364	0.9521
v5019	3.543	1.411
v506 + v4184	2.040	1.542

Le curve di legame nella linea cellulare di fibroblasti polmonari WI-38 sono mostrate nella Figura 6G e nella Tabella 10. La linea cellulare WI-38 è un epitelio polmonare normale che esprime livelli basali (HER2 0+, ~10.000 recettori/cellula) di HER2 (Carter et al. 1992, PNAS, 89:4285-4289; Yarden 2000, HER2: Basic Research, Prognosis and Therapy). Questi risultati mostrano che gli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi (v5019, v7091, v10000) mostrano una decorazione della superficie cellulare equivalente (Bmax) nel legame alle cellule WI-38 rispetto a un FSA anti-HER2 (v506); tuttavia, si noti che il legame per v506 non sembra raggiungere la saturazione e, pertanto, non può essere determinata la K_D . La K_D apparente tra gli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi era equivalente.

Tabella 10: Legame alle cellule WI-38

Variante di anticorpo	K_D (nM)	Bmax
v506	Non determinata	~366
v5019	7.0	380
v7091	8.3	371
v10000	8.4	418

Questi risultati mostrano che un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo può legarsi alle cellule tumorali HER2 1+, 2+ e 3+ a livelli che sono approssimativamente da 1,5 a 1,6 volte superiori rispetto a un FSA monospecifico anti-HER2, e che anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi possono legarsi alle cellule tumorali HER2 1+, 2+ e 3+ a livelli equivalenti rispetto alla combinazione di due FSA anti-HER2 monospecifici esclusivi con differenti specificità di epitopo. Questi risultati inoltre mostrano che gli anticorpi anti-HER2 biparatopici non mostrano un legame aumentato (vale a dire rispetto all'anticorpo anti-HER2 monospecifico, v506) alle cellule basali, che esprimono HER2, che esprimono approssimativamente 10.000 ricettori HER2/cellula o meno, e che una soglia per un legame di superficie cellulare aumentato agli anticorpi anti-HER2

biparatopici avviene quando il livello del recettore HER2 è approssimativamente >10.000 recettori/cellula. In base a questi dati, può essere previsto che gli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi hanno un legame di superficie cellulare aumentato con le cellule tumorali HER2 3+, 2+ e 1+, tuttavia, non possono avere un legame di superficie cellulare aumentato con le cellule non tumorali che esprimono livelli basali del recettore HER2 con approssimativamente 10.000 recettori o meno.

Esempio 7: Capacità dell'anticorpo anti-HER2 biparatopico di inibire la crescita delle cellule HER2+

È stata misurata la capacità di un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo di inibire la crescita delle cellule che esprimono HER2 al livello 3+ e 2+. L'esperimento è stato eseguito nelle linee cellulari HER2 3+ BT-474, SKBr3, SKOV3 e HER2 2+ JIMT-1. Gli anticorpi anti-HER2 biparatopici v5019, v7091 e v10000 sono stati testati. La capacità degli anticorpi anti-HER2 biparatopici di inibire la crescita delle cellule BT-474 (200 nM anticorpo), delle cellule SKOV3, SKBr3 e JIMT-1 (300 nM anticorpo) è stata misurata come descritto di seguito.

Gli anticorpi di test sono stati diluiti nel terreno e aggiunti alle cellule a 10 µl/pozzetto in triplicato. Le piastre sono state incubate per 3 giorni a 37 °C. La vitalità cellulare è stata misurata usando AlamarBlue™ (Biosource # dal1100) o Celltiter-Glo® e l'assorbanza è stata letta secondo le istruzioni del produttore. I dati sono stati normalizzati rispetto al controllo non trattato e l'analisi è stata eseguita in GraphPad Prism.

I risultati di inibizione di crescita sono mostrati nella Figura 7A-E. Un riepilogo dei risultati è fornito nelle Tabelle 11A e 11B. I risultati delle Figure 7A-B e della Tabella 11A indicano che (v5019) biparatopico anti-HER2 esemplificativo è in grado di inibire la crescita delle linee cellulari HER2+ SKOV3 e BT-474. La Figura 10A mostra che l'anticorpo biparatopico anti-HER2 ha mediato l'inibizione di crescita massima di SKOV3 quando confrontato con FSA anti-HER2 (v506) e quando confrontato con la combinazione di due anticorpi FSA anti-HER2 (v506 + v4184).

Tabella 11A: Inibizione della crescita di cellule cancerose HER2 3+

Trattamento	% di sopravvivenza	
	SKOV3 HER2 2+/3+	BT-474 HER2 3+
v506	88	37
v506 + v4184	96	32
v5019	77	43

I risultati nelle Figure 7C-E e nella Tabella 11B indicano che gli anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi (v5019, v7091 e v10000) possono inibire la crescita delle linee cellulari tumorali HER2 3+ SKBR3, HER2 2+/3+ SKOV3 e HER2 2+ JIMT-1. La Figura 7C mostra che gli anticorpi biparatopici anti-HER2 v7091 e v10000 hanno mediato l'inibizione di crescita massima delle cellule tumorali mammarie HER2 3+ SKBr3. La Figura 7D mostra che gli anticorpi biparatopici anti-HER2 (v7091 e v10000) hanno mediato l'inibizione di crescita massima delle cellule

tumorali ovariche HER2 3+ SKOV3. La Figura 7E mostra che gli anticorpi biparatopici anti-HER2 (v7091 e v10000) hanno mediato l'inibizione di crescita massima delle cellule tumorali JIMT-1 HER2 2+ resistenti a Herceptin. In tutte le linee cellulari testate, gli anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi (v7091 e v10000) hanno mediato un'inibizione di crescita maggiore rispetto all'anticorpo monospecifico FSA anti-HER2 (v506).

Tabella 11B: Inibizione della crescita di cellule cancerose HER2 3+

Trattamento	% di sopravvivenza		
	SKBr3 HER2 3+	SKOV3 HER2 2+/3+	JIMT-1 HER2 2+
v506	52	107	107
v5019	59	83	106
v7091	35	79	85
v10000	34	73	84

Questi risultati mostrano che concentrazioni di saturazione esemplificative di anticorpi anti-HER2 biparatopici possono inibire la crescita delle cellule tumorali mammarie e ovariche HER2 3+ e 2+ e delle cellule tumorali HER2 2+ resistenti a Trastuzumab approssimativamente del 20% in più rispetto a un anticorpo monospecifico FSA anti-HER2.

Esempio 8: Legame preferenziale di paratopi di anticorpi anti-HER2 biparatopici a HER2 dimerico rispetto a ECD di HER2

Questo esperimento è stato eseguito per determinare la capacità dei singoli paratopi di anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi di legarsi a HER2 dimerico e a ECD di HER2 come surrogato per il legame differenziale tra HER2 legato alla membrana (HER2-Fc) e ECD di HER2 disperso. L'esperimento è stato eseguito come segue.

Analisi mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR): affinità di anticorpi anti-HER2 monovalenti (v1040 o v4182) per il legame al dominio extracellulare di HER2 (sHER-2, Ebioscience BMS362, amminoacido codificante 23 - 652 della proteina a lunghezza completa) e HER2-Fc (fusione di HER2-Fc dimerico codificante l'amminoacido 1 - 652 del dominio extracellulare; Sino Biological Inc., 10004-H02H) è stata misurata mediante SPR usando il sistema T200 di Biacore (GE Healthcare). Il legame a ECD di HER2 è stato determinato mediante il seguente metodo. L'ECD di HER2 in 10 mM di HEPES a pH 6,8 è stato immobilizzato su chip CM5 attraverso accoppiamento amminico a un livello di 44 RU (unità di risposta). Gli anticorpi anti-HER2 monovalenti hanno attraversato la superficie del chip immobilizzato con HER2 a concentrazioni nell'intervallo di 0,76-60 nM. Il legame a HER2-Fc è stato determinato mediante il seguente metodo. HER2-Fc in 10 mM di HEPES pH 6,8 è stato immobilizzato su chip CM5 attraverso accoppiamento amminico a un livello di 43 RU. Gli anticorpi anti-HER2 monovalenti hanno attraversato la superficie del chip immobilizzato con HER2 a concentrazioni nell'intervallo di 0,76-60 nM. Le concentrazioni di anticorpo sono state analizzate per il legame in triplicato. Le costanti di legame di dissociazione all'equilibrio (K_D) e la cinetica (k_a e k_d) sono state determinate usando il metodo della cinetica a

ciclo singolo. I sensogrammi sono stati adattati globalmente a un modello di legame di Langmuir 1: 1. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti a temperatura ambiente.

I risultati sono mostrati nella Figura 8A, Figura 8B, Tabella 11C e Tabella 11D. I risultati nella Figura 8A e nella Tabella 11C mostrano i dati di legame di SPR dell'anticorpo anti-HER2 monovalente (v1040; rappresentante il dominio legante l'antigene su CH-B dell'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo). La Figura 8A illustra i valori di K_D (nM) del legame di v1040 con ECD di HER2 immobilizzato o HER2-Fc e mostra che l'anticorpo anti-HER2 monovalente ha una K_D inferiore per il legame a HER2-Fc rispetto a ECD di HER2. La Tabella 11C mostra i valori di k_a (1/M s) e k_d (1/s) dell'anticorpo anti-HER2 monovalente (OA) rispetto all'anticorpo anti-HER2 a grandezza intera (FSA) nel legame a ECD di HER2 e HER2-FC ('HER2 mem'). Questi dati mostrano tassi di associazione (k_a) e dissociazione (k_d) comparabili di OA e FSA per il legame a ECD di HER2 e HER2-Fc.

Tabella 11C: Valori di k_a (1/M s) e k_d (1/s) dell'anticorpo anti-HER2 monovalente (OA) rispetto all'anticorpo anti-HER2 a grandezza intera (FSA) nel legame a ECD di HER2 e HER2-FC ('HER2 mem')

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
OA vs ECD di HER2	2.00E+05	6.15E-05
FSA vs ECD di HER2	4.14E+05	2.01E-05
OA vs HER2 mem	1.88E+05	4.38E-05
FSA vs HER2 mem	3.41E+05	4.94E-06*

I risultati nella Figura 8B e nella Tabella 11D mostrano i dati di legame di SPR dell'anticorpo anti-HER2 monovalente (v4182; rappresentante il dominio legante l'antigene su CH-A dell'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo). La Figura 8B illustra i valori di K_D (nM) del legame di v4182 con ECD di HER2 immobilizzato o HER2-Fc e mostra che l'anticorpo anti-HER2 monovalente ha una K_D inferiore per il legame a HER2-Fc rispetto a ECD di HER2. La Tabella 11D mostra i valori di k_a (1/M s) e k_d (1/s) dell'anticorpo anti-HER2 monovalente (OA) rispetto all'anticorpo anti-HER2 a grandezza intera (FSA) nel legame a ECD di HER2 e HER2-FC ('HER2 mem'). Questi dati mostrano tassi di associazione (k_a) e tassi di dissociazione (k_d) comparabili di OA e FSA per il legame a ECD di HER2 e HER2-Fc.

Tabella 11D:

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
OA vs ECD di HER2	9.08E+04	6.17E-04
FSA vs ECD di HER2	9.55E+04	3.93E-04
OA vs HER2 mem	1.39E+05	2.04E-04
FSA vs HER2 mem	1.77E+05	6.84E-05

Questi dati mostrano che ciascuno dei paratopi dell'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo ha valori K_D inferiori per il legame all'antigene HER2 dimerico, un rappresentante di HER2 legato alla membrana, rispetto a ECD di HER2. In base a questi dati, può essere previsto che l'anticorpo anti-HER2 esemplificativo ha una maggiore affinità di legame per l'antigene HER2 legato alla membrana rispetto a ECD di HER2 disperso, che è presente nel siero dei pazienti malati e può fungere da serbatoio per l'anticorpo terapeutico (Brodowicz T, et al. Soluble HER-2/neu neutralizes biologic effects of anti-HER-2/neu antibody on breast cancer cells in vitro. Int J Cancer. 1997; 73:875-879). Per esempio, i livelli di ECD di HER2 al basale sono ≤ 15 ng/ml; mentre i pazienti affetti da malattia progressiva hanno ECD di HER2 ≥ 38 ng/ml.

Esempio 9: Carico di cellula intera e internalizzazione di anticorpo anti-HER2 biparatopico nelle cellule HER2 +

Questo esperimento è stato eseguito per valutare la capacità di un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo di essere internalizzato nelle cellule HER2 2+. Il metodo di internalizzazione diretta è stato seguito secondo il protocollo dettagliato in Schmidt, M. et al., *Kinetics of anti-carcinoembryonic antigen antibody internalization: effects of affinity, bivalency, and stability*. Cancer Immunol Immunother (2008) 57:1879-1890. Nello specifico, gli anticorpi sono stati marcati direttamente usando il kit di marcatura delle proteine AlexaFluor® 488 (Invitrogen, cat. no. A10235) secondo le istruzioni del produttore.

Per il saggio di internalizzazione, le piastre a 12 pozzetti sono state seminate con 1×10^5 cellule / pozzetto e incubate per una durata di tempo pari a una notte a $37^\circ\text{C} + \text{CO}_2$ al 5%. Il giorno successivo, gli anticorpi marcati sono stati aggiunti a 200 nM in DMEM + FBS al 10% e incubati per 24 ore a $37^\circ\text{C} + \text{CO}_2$ al 5%. In condizioni di oscurità, il terreno è stato aspirato e i pozzetti sono stati lavati in $2 \times 500 \mu\text{l}$ di PBS. Per raccogliere le cellule, è stato aggiunto un tampone di dissociazione cellulare ($250 \mu\text{l}$) a 37°C . Le cellule sono state pellettizzate e risospese in $100 \mu\text{l}$ di DMEM + FBS al 10% senza o con anti-Alexa Fluor 488, frazione di IgG di coniglio (Molecular Probes, A11094) a $50 \mu\text{g/ml}$, e incubate su ghiaccio per 30 min. Prima dell'analisi, $300 \mu\text{l}$ di DMEM + FBS al 10% i campioni filtrati sono stati aggiunti $4 \mu\text{l}$ di ioduro di propidio. I campioni sono stati analizzati usando citometro a flusso LSRII.

La capacità dell'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo di internalizzarsi nelle cellule HER2+ è mostrata nella Figura 9A e nella Figura 9B. La Figura 9A mostra i risultati della superficie e dell'anticorpo interno rilevabili nelle cellule BT-474 dopo 24 ore di incubazione con l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo e il controllo con FSA anti-HER2. Questi risultati mostrano che l'incubazione con l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v5019) ha come risultato un anticorpo internalizzato approssimativamente due volte in più nelle cellule BT-474 rispetto al controllo con FSA anti-HER2. La Figura 9B mostra i risultati della superficie rilevabile e dell'anticorpo interno nelle cellule JIMT-1

dopo 24 ore di incubazione con l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo e il controllo con FSA anti-HER2. Questi risultati mostrano che l'incubazione con anticorpo biparatopico esemplificativo anti-HER2 (v5019) ha come risultato un anticorpo internalizzato approssimativamente due volte in più nelle cellule JIMT-1 rispetto al controllo con FSA anti-HER2. La quantità di colorazione della superficie dopo 24 ore era comparabile tra anti-HER2 biparatopico e FSA anti-HER2 sia nelle cellule BT-474 sia nelle cellule JIMT-1.

I risultati nelle Figure 10A-F mostrano un confronto dell'anticorpo rilevabile legato alla superficie delle cellule intere dopo 2 ore a 4 °C, rispetto all'anticorpo legato alla superficie dopo incubazione per 24 ore a 37 °C; oltre alla quantità di anticorpo internalizzato dopo 24 ore a 37 °C. La Figura 10A mostra i risultati nelle cellule BT-474 dopo l'incubazione con l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo e il controllo con FSA anti-HER2. Questi risultati mostrano che l'incubazione dell'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo con le cellule BT-474 per 24 ore ha come risultato approssimativamente una riduzione del 15% dell'anticorpo rilevato sulla superficie delle cellule intere. La Figura 10A mostra inoltre che l'incubazione con l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v5019) ha come risultato un anticorpo internalizzato approssimativamente due volte in più nelle cellule BT-474 rispetto al controllo con FSA anti-HER2.

La Figura 10B mostra i risultati nelle cellule JIMT-1 dopo l'incubazione con l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo e il controllo con FSA anti-HER2. La Figura 10B è una ripetizione dell'esperimento mostrato nella Figura 9B con l'aggiunta della colorazione di superficie dopo 2 ore a 4 °C. Questi risultati mostrano che l'incubazione dell'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo con le cellule JIMT-1 per 24 ore ha come risultato approssimativamente una riduzione del 57% dell'anticorpo rilevato sulla superficie delle cellule intere. La Figura 10B mostra inoltre che l'incubazione con l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v5019) ha come risultato un anticorpo più internalizzato nelle cellule BT-474 dopo 24 ore di incubazione a 37 °C rispetto al controllo con FSA anti-HER2.

La Figura 10C mostra i risultati nelle cellule SKOV3 dopo l'incubazione con l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo. Questi risultati mostrano che l'incubazione dell'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo con le cellule SKOV3 per 24 ore ha come risultato approssimativamente una riduzione del 32% dell'anticorpo rilevato sulla superficie delle cellule intere.

La Figura 10D mostra i risultati nelle cellule MCF7 dopo l'incubazione con l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo. Questi risultati mostrano che l'incubazione dell'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo con le cellule MCF7 per 24 ore ha come risultato approssimativamente una riduzione del 45% dell'anticorpo rilevato sulla superficie delle cellule intere.

La Figura 10E mostra i risultati nelle cellule SKOV3 dopo l'incubazione con gli anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi, v5019, v7091 e v10000. Questi risultati mostrano che l'incubazione degli anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi ha come risultato un anticorpo

internalizzato da 1,5 a 1,8 volte in più con le cellule SKOV3 rispetto al controllo con FSA anti-HER2. L'incubazione con il controllo con FSA anti-HER2 per 24 ore ha come risultato la riduzione massima (-77%) dell'anticorpo rilevato sulla superficie delle cellule intere.

La Figura 10F mostra i risultati nelle cellule JIMT-1 dopo l'incubazione con gli anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi, v5019, v7091 e v10000. Questi risultati mostrano che l'incubazione degli anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi ha come risultato un anticorpo internalizzato da 1,4 a 1,8 volte in più con le cellule JIMT-1 rispetto al controllo con FSA anti-HER2. L'incubazione con gli anticorpi biparatopici anti-HER2 (v5019 e v10000) per 24 ore ha come risultato la riduzione massima (-64%) dell'anticorpo rilevato sulla superficie delle cellule intere.

Questi risultati mostrano che gli anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi hanno proprietà di internalizzazione superiori nelle cellule HER2+ rispetto a un FSA anti-HER2 monospecifico. La riduzione dell'anticorpo di superficie rilevato dopo 24 ore di incubazione a 37 °C mostra che un anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo è in grado di ridurre la quantità di recettore HER2 sulla superficie cellulare dopo l'incubazione nelle cellule HER2+ e che la riduzione di HER2 superficiale post incubazione è massima nelle cellule tumorali HER2 2+.

Esempio 10: Colorazione cellulare e localizzazione di un anticorpo biparatopico anti-HER2 dopo incubazione con cellule HER2+ a 1, 3 e 16 ore

Questo esperimento è stato eseguito per analizzare l'internalizzazione dell'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo nelle cellule HER2+ JIMT-1 in differenti punti temporali e come metodo ortogonale a quello presentato nell'Esempio 9 per analizzare il carico di cellula intera e l'internalizzazione.

Le cellule JIMT-1 sono state incubate con l'anticorpo (v506, v4184, v5019 o una combinazione di v506 e v4184) a 200 nM in DMEM senza siero, 37 °C + CO₂ al 5% per 1 ora, 3 ore e 16 ore. Le cellule sono state lavate delicatamente due volte con PBS sterile riscaldato (500 ml/pozzetto). Le cellule sono state fissate con 250 ml di soluzione di formalina/PBS al 10% per 10 min a RT. Le cellule fissate sono state lavate tre volte con PBS (500 µl/pozzetto), permeabilizzate con 250 µl/pozzetto di PBS contenente Triton X-100 allo 0,2% per 5 min e lavate tre volte con 500 µl/pozzetto di PBS. Le cellule sono state bloccate con 500 µl/pozzetto di PBS + siero di capra al 5% per 1 ora a RT. Il tampone di bloccaggio è stato rimosso e 300 µl/pozzetto di anticorpo secondario (Frammento Fab AffiniPure coniugato con Alexa Fluor 488 di IgG antiumana di capra (H+L); Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; 109-547-003) sono stati incubati per 1 ora a RT. Le cellule sono state lavate tre volte con 500 µl/pozzetto di PBS e, successivamente, i copri vetrini contenenti cellule fissate sono stati montati su un vetrino usando Prolong gold anti-fade con DAPI (Life Technologies; #P36931). Immagini singole 60X sono state acquisite usando il microscopio confocale Olympus FV1000.

I risultati hanno indicato che l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v5019) è stato internalizzato nelle cellule JIMT-1 a 3

ore ed è stato principalmente localizzato vicino ai nuclei. Il confronto delle immagini a 3 ore di incubazione ha mostrato una maggiore quantità di colorazione interna associata all'anticorpo biparatopico anti-HER2 rispetto alla combinazione di due anti-HER2 FSA (v506 + v4184) e rispetto a FSA anti-HER2 singolo (v506 o v4184). Differenze nella localizzazione cellulare della colorazione di anticorpo sono state osservate quando i risultati dell'anticorpo biparatopico anti-HER2 (v5019) sono stati confrontati con FSA anti-HER2 (v4184); in cui FSA anti-HER2 (v4184) ha mostrato una marcata colorazione della membrana plasmatica nei punti temporali di 1, 3 e 16 ore. La quantità di anticorpo rilevabile è stata ridotta a 16 ore per FSA anti-HER2 (v506), la combinazione di due trattamenti di anticorpo FSA anti-HER2 (v506 + v4184) e anticorpo biparatopico anti-HER2 (dati non mostrati).

Questi risultati mostrano che l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo v5019 è stato internalizzato nelle cellule HER2+ e l'anticorpo internalizzato era rilevabile dopo 3 ore di incubazione. Questi risultati sono coerenti con i risultati presentati nell'Esempio 9 che mostrano che l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo può internalizzarsi in quantità maggiori nelle cellule HER2+ rispetto a un FSA anti-HER2.

Esempio 11: ADCC di cellule HER2+ mediata da anticorpo anti-HER2 biparatopico rispetto ai controlli

Questo esperimento è stato eseguito al fine di misurare la capacità di un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo di mediare l'ADCC nelle cellule SKOV3 (cancro ovarico, HER2 2+/3+).

Le cellule target sono state pre-incubate con anticorpi di test (concentrazioni 10 volte decrescenti a partire da 45 µg/ml) per 30 minuti, seguite dall'aggiunta di cellule effettrici con un rapporto cellula effettrice/target di 5:1 e l'incubazione è continuata per 6 ore a 37 °C + CO₂ al 5%. I campioni sono stati testati con 8 concentrazioni, 10 volte decrescenti a partire da 45 µg/ml. Il rilascio di LDH è stato misurato usando il kit di saggio di LDH.

Studi di dose-risposta sono stati eseguiti con varie concentrazioni dei campioni con rapporti effettrice/target (E/T) di 5:1, 3:1 e 1:1. I valori di concentrazione semimassimale efficace (EC₅₀) sono stati analizzati con l'adattamento di regressione non lineare dose-risposta sigmoide usando GraphPad Prism.

Le cellule sono state mantenute in terreno completo McCoy's 5a medium a 37 °C / CO₂ al 5% e regolarmente subcoltivate con terreno idoneo integrato con FBS al 10% secondo il protocollo di ATCC. Le cellule con numero di passaggio inferiore a p10 sono state usate nei saggi. I campioni sono stati diluiti a concentrazioni tra 0,3-300 nM con terreno di DMEM privo di fenolo rosso, integrato con FBS all'1% e 1% pen/strep, prima dell'uso nel saggio.

I risultati di ADCC in cellule HER2+ SKOV3 con un rapporto cellula effettrice e cellula target di 5:1 sono mostrati nella Figura 11A e

nella Tabella 12. Questi risultati mostrano che l'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v5019) ha mediato la percentuale massima di lisi massima delle cellule target mediante ADCC quando confrontato con anti-HER2 FSA (v792) e la combinazione di due FSA anti-HER2 FSA (v792+v4184). La differenza nella lisi cellulare massima mediata dall'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo era approssimativamente 1,6 volte maggiore rispetto a un FSA anti-HER2, e approssimativamente 1,2 volte maggiore rispetto a una combinazione di due FSA anti-HER2 differenti (v792 + v4184).

Tabella 12

Variante di anticorpo	EC ₅₀ (nM)	% di lisi cellulare massima
v792	~0.032	17.82
v5019	~0.164	28.57
v792 + v4184	~0.042	23.85

I risultati ADCC in cellule SKOV3 HER2+ con un rapporto di cellule effettrici e cellule target di 3:1 sono mostrati nella Figura 11B e nella Tabella 13. Questi risultati mostrano che l'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v5019) ha mediato la percentuale massima di lisi massima delle cellule target mediante ADCC quando confrontato con anti-HER2 FSA (v792) e la combinazione di due FSA anti-HER2 FSA (v792+v4184). La differenza nella lisi cellulare massima mediata dall'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo era approssimativamente 1,3 volte maggiore rispetto a FSA anti-HER2, e approssimativamente 1,8 volte maggiore rispetto a una combinazione di due FSA anti-HER2 differenti (v792 + v4184).

Tabella 13:

Variante di anticorpo	EC ₅₀ (nM)	% di lisi cellulare massima
v792	1.064	16.9
v5019	~0.4608	22.3
v792 + v4184	~1.078	12.3

I risultati di ADCC in cellule SKOV3 HER2+ con un rapporto cellula effettrice e cellula target di 1:1 sono mostrati nella Figura 11C e nella Tabella 14. Questi risultati mostrano che l'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v5019) ha mediato la percentuale massima di lisi massima di cellule target mediante ADCC quando confrontato con FSA anti-HER2 (v792) e la combinazione di due FSA anti-HER2 differenti (v792+v4184). La differenza nella lisi cellulare massima mediata dall'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo era approssimativamente 1,8 volte maggiore rispetto a FSA anti-HER2, e approssimativamente 1,13 volte maggiore rispetto a una combinazione di due FSA anti-HER2 differenti

(v792 + v4184).

Tabella 14:

Variante di anticorpo	EC₅₀ (nM)	% di lisi cellulare massima
v792	1.429	7.529
v5019	~1.075	13.29
v792 + v4184	~0.1121	11.73

I risultati nella Figura 11 e nelle Tabelle 12-14 mostrano che l'anticorpo HER2 biparatopico esemplificativo media l'ADCC massimo delle cellule SKOV3 con rapporti E:T differenti quando confrontato con un FSA anti-HER2 e la combinazione di due FSA anti-HER2. L'osservazione di un'ADCC aumentata mediata dall'anticorpo biparatopico anti-HER2 può essere prevista in pazienti affetti da HER2+ che esprimono cellule effettrici circolanti variabili e/o ridotte a seguito di chemioterapia (Suzuki E. et al. Clin Cancer Res 2007;13:1875-1882). Le osservazioni nella Figura 11 sono coerenti con i dati di legame Bmax dell'intera cellula presentati nell'Esempio 6, che mostrano un aumento approssimativo di 1,5 volte nel legame cellulare all'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo rispetto a FSA anti-HER2.

Esempio 12: Capacità dell'anticorpo anti-HER2 esemplificativo di legarsi a ECD di HER2

Un saggio di SPR è stato usato per valutare il meccanismo mediante il quale un anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo si lega a ECD di HER2; nello specifico, per comprendere se entrambi i paratopi di una molecola di anticorpo biparatopico possono legarsi a un ECD di HER2 (legame Cis; 1:1 anticorpo e molecole di HER2) o se ciascun paratopo di un anticorpo biparatopico può legarsi a due ECD di HER2 differenti (legame Trans; 1:2 anticorpo e molecole di HER2). Una rappresentazione del legame cis vs trans è illustrata nella Figura 14. La correlazione tra un tasso di dissociazione ridotto (più lento) con l'aumento dei livelli di cattura di anticorpo (densità della superficie) è un'indicazione di legame Trans (vale a dire una molecola di anticorpo che si lega a due molecole di HER2).

L'affinità e la cinetica di legame dell'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v5019) a HER2 umano ricombinante sono state misurate e confrontate con quelle degli anticorpi anti-HER2 monovalenti (v630 o v4182; comprendenti i singoli paratopi di v5019) misurate mediante SPR usando il sistema T200 di Biacore (GE Healthcare). Tra 2000 e 4000 RU di Fc antiumano iniettato a una concentrazione tra 5 e 10 µg/ml sono state immobilizzate su un chip CM5 usando accoppiamento amminico standard. L'anticorpo anti-HER2 monovalente (v630 o v4182) e l'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v5019) sono stati catturati su Fc antiumano (iniettato a una concentrazione compresa tra 0,08 e 8 µg/ml in PBST, 1 min a 10 ul/min) a livelli di risposta compresi tra 350 - 15 RU. HER2 umano ricombinante è stato diluito in PBST e iniettato a concentrazione

iniziale di 120 nM, 200 nM o 300 nM con triplice diluizione e iniettato a una portata di 50 μ l/min per 3 minuti, seguito da dissociazione per altri 30 minuti al termine dell'ultima iniezione. Le diluizioni di HER2 sono state analizzate in duplicato. I sensogrammi sono stati adattati globalmente a un modello di legame di Langmuir 1: 1. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti a 25 °C.

I risultati sono mostrati nella Figura 12 e nella Figura 13.

I risultati nella Figura 12A mostrano k_a (1/Ms) di anti-HER2 monovalente (v630 e v4182) e anticorpo anti-HER2 bivalente esemplificativo (v5019) per il legame a HER2 umano ricombinante su un intervallo di concentrazione di anticorpo iniettato e catturato sulla superficie del chip. Questi risultati mostrano che k_a non cambia per v630, v4182 e v5019 a differenti livelli di cattura dell'anticorpo.

I risultati nella Figura 12B mostrano k_d (1/s) di anti-HER2 monovalente (v630 e v4182) e anticorpo anti-HER2 bivalente esemplificativo (v5019) per il legame a HER2 umano ricombinante in un intervallo di concentrazione di anticorpo iniettato e catturato sulla superficie del chip. Questi risultati mostrano che k_d è diminuito soltanto per l'anticorpo bivalente anti-HER2 esemplificativo (v5019) a livelli crescenti di cattura dell'anticorpo.

I risultati nella Figura 12C mostrano la K_D (M) di anti-HER2 monovalente (v630 e v4182) e anticorpo anti-HER2 bivalente esemplificativo (v5019) per il legame a HER2 umano ricombinante in un intervallo di concentrazioni di anticorpo iniettato e catturato sulla superficie del chip. Questi risultati mostrano che K_D è diminuita soltanto per l'anticorpo bivalente anti-HER2 esemplificativo (v5019) a livelli crescenti di cattura dell'anticorpo. Questo risultato ha messo in correlazione i valori k_d decrescenti mostrati nella Figura 15B.

I risultati nella Figura 13A mostrano k_d (1/s) dell'anticorpo anti-HER2 bivalente esemplificativo (v5019) per il legame a HER2 umano ricombinante in un intervallo di livelli di cattura dell'anticorpo. Questi risultati mostrano che i valori k_d sono inversamente proporzionali a RU maggiori di anticorpo catturate sulla superficie del chip (vale a dire tassi di dissociazione più lenti con livelli di cattura dell'anticorpo maggiori). I risultati indicano che l'anticorpo anti-HER2 bivalente esemplificativo (v5019) è in grado di legare ECD2 di HER2 e ECD4 di HER2 su due molecole di HER2 separate (vale a dire legame trans) come è evidenziato dalla riduzione del tasso di dissociazione a livelli di cattura dell'anticorpo maggiori. Questi dati sono supportati da un esperimento simile presentato nella Figura 47 ed esaminati nell'Esempio 43, in cui FSA anti-HER2 monospecifico bivalente (v506) ha dimostrato il legame Cis (1: 1 anticorpo e HER2), in cui i valori di k_d (1/s) e K_D (M) sono rimasti costanti a livelli di cattura dell'anticorpo crescenti come è previsto per questa molecola.

I risultati nella Figura 13B mostrano il k_d (1/s) dell'anticorpo anti-HER2 monovalente (v4182) per il legame a HER2 umano ricombinante in un intervallo di livelli di cattura dell'anticorpo. Questi risultati non mostrano alcun cambiamento nei valori di k_d in un intervallo di RU di anticorpo

differenti catturate sulla superficie del chip. Questi risultati mostrano che l'anticorpo anti-HER2 monovalente (v4182) è legato in modo monovalente 1:1 (legame cis).

I risultati nella Figura 13C mostrano il kd (1/s) dell'anticorpo anti-HER2 monovalente (v630) per il legame a HER2 umano ricombinante in un intervallo di livelli di cattura dell'anticorpo. Questi risultati non mostrano alcun cambiamento nei valori di kd in un intervallo di RU di anticorpo differenti catturate sulla superficie del chip. Questi risultati mostrano che l'anticorpo anti-HER2 monovalente (v630) è legato in modo monovalente 1:1 (legame cis). Questi dati sono supportati dall'esperimento presentato nella Figura 47 ed esaminati nell'Esempio 43X, in cui FSA anti-HER2 monospecifico bivalente (v506) non ha mostrato alcun cambiamento nel kd (1/s).

I risultati nelle Figure 12 e nella Figura 13 indicano che l'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v5019) è in grado di legarsi simultaneamente a due molecole di HER2 in trans (rapporto anticorpo e HER2 1:2). Il meccanismo di legame trans rilevato mediante SPR è coerente con i dati di legame di saturazione di superficie cellulare più elevati (Bmax), presentati nell'Esempio 6, in combinazione con i dati di internalizzazione presentati negli Esempi 9 e 10.

Esempio 13: Effetto dell'incubazione di anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo sulla fosforilazione di AKT nelle cellule BT-474

La capacità di un anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo di ridurre la segnalazione di pAKT nelle cellule BT-474 è stata testata usando il Kit AKT Colorimetric In-Cell ELISA (Thermo Scientific; n. cat. 62215) secondo le istruzioni del produttore con le seguenti modifiche. Le cellule sono state seminate 5×10^3 /pozzetto e incubate per 24 ore a $37^\circ\text{C} + \text{CO}_2$ al 5%. Le cellule sono state incubate con 100 nM di anticorpo per 30 min, seguite da un'incubazione di 15 min con rhHRG- β 1. Le cellule sono state lavate, fissate e permeabilizzate secondo le istruzioni. Anticorpi secondari (1:5000; Jackson ImmunoResearch, IgG anti-murina di asino HRP, JIR, Cat#715-036-150, IgG anti-coniglio di asino HRP, JIR, Cat#711-036-452) sono stati aggiunti e il saggio è stato processato secondo le istruzioni del produttore.

I risultati nella Figura 15 mostrano che l'incubazione con un anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo ha mediato una riduzione approssimativa di 1,2 volte nei livelli di p-Akt in presenza di HRG β 1 rispetto al controllo con IgG umana (CTL). La combinazione di due FSA HER2 (v506 + v4184) ha mediato la riduzione massima nei livelli di p-Akt in presenza di HRG β 1, che era approssimativamente 1,5 volte inferiore rispetto al controllo con IgG umana. Una modesta riduzione di p-Akt è stata rilevata con l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo in assenza di ligando (HRG β 1) rispetto all'anticorpo di controllo IgG umana.

Questi dati mostrano che l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo può bloccare la segnalazione attivata dal ligando nelle cellule HER2+.

Esempio 14: Effetto di anticorpo anti-HER2 biparatopico sulla vitalità dei cardiomiociti

L'effetto degli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi e degli ADC sulla vitalità dei cardiomiociti è stato misurato al fine di ottenere un'indicazione preliminare degli effetti potenzialmente cardiotossici.

I cardiomiociti iCell (Cellular Dynamics International, CMC-100-010), che esprimono livelli basali del recettore HER2, sono cresciuti secondo le istruzioni del produttore e usati come cellule target per valutare la salute dei cardiomiociti a seguito del trattamento con anticorpo. Il saggio è stato eseguito come segue. Le cellule sono state seminate in piastre a 96 pozzetti (15.000 cellule/pozzetto) e mantenute per 48 ore. Il terreno cellulare è stato sostituito con il terreno di manutenzione e le cellule sono state mantenute per 72 ore. Per avere accesso agli effetti della cardiotossicità indotta da anticorpi, le cellule sono state trattate per 72 ore con 10 e 100 nM di varianti da sole o in combinazioni. Per avere accesso agli effetti della cardiotossicità indotta da antraciclina (da sola o in combinazione con gli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi), le cellule sono state trattate con 3 μM ($\sim\text{IC}_{20}$) di doxorubicina per 1 ora seguita da 72 ore con 10 e 100 nM di varianti di anticorpo da sole o in combinazioni. La vitalità cellulare è stata valutata quantificando i livelli di ATP cellulare con il saggio di vitalità cellulare luminescente CellTiter-Glo[®] (Promega, G7570) e/o sulforodamina (Sigma 230162-5G) secondo le istruzioni del produttore.

I risultati sono mostrati nella Figura 16A-C. I risultati nella Figura 16A mostrano che l'incubazione dei cardiomiociti con concentrazioni terapeutamente rilevanti di anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v5019) e ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v6363) non ha influenzato la vitalità dei cardiomiociti rispetto al controllo non trattato ('mock').

I risultati nella Figura 16B mostrano che l'incubazione dei cardiomiociti con concentrazioni terapeutamente rilevanti di anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi (v5019, v7091 e v10000) e ADC biparatopici anti-HER2 esemplificativi (v6363, v7148 e v10553) non ha avuto effetti sulla vitalità dei cardiomiociti rispetto al controllo non trattato ('mock'). In base ai risultati nella Figura 16A e 16B, è previsto che anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi e ADC biparatopici anti-HER2 esemplificativi non dovrebbero indurre cardiomiopatia, per esempio attraverso disfunzione mitocondriale, come è riportato con altri anticorpi di targeting anti-HER2 (Grazette L.P. et al. Inhibition of ErbB2 Causes Mitochondrial Dysfunction in Cardiomyocytes; Journal of the American College of Cardiology; 2004; 44:11).

I risultati nella Figura 16C mostrano che il pretrattamento dei cardiomiociti con doxorubicina, seguito da incubazione con concentrazioni terapeutamente rilevanti di anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi (v5019, v7091 e v10000) e ADC biparatopici anti-HER2 esemplificativi (v6363, v7148 e v10553), non ha avuto effetto sulla vitalità dei cardiomiociti rispetto al controllo non trattato + doxorubicina ('Mock + Dox'). Basandosi sui risultati nella Figura 16C, è previsto che anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi e ADC biparatopici anti-HER2 esemplificativi

non dovrebbero avere come risultato un rischio aumentato di disfunzione cardiaca nei pazienti che ricevono contemporaneamente trattamento con antracicline (Seidman A, Hudis C, Pierri MK, et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. J Clin Oncol (2002) 20:1215-1221).

Le Figure 16A-C mostrano che l'incubazione dei cardiomiociti con gli anticorpi biparatopici anti-HER2 e gli ADC ha avuto effetti equivalenti rispetto all'anticorpo FSA anti-HER2 monospecifico (v506), alla combinazione FSA anti-HER2 (v506 + v4184) e all'ADC (v6246) quando trattati sia da soli sia in combinazione con doxorubicina. In base a questi risultati, è previsto che gli anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi e gli ADC non abbiano effetti cardiotossici maggiori rispetto a FSA anti-HER2 anti-monospecifico, trastuzumab o ADC, T-DM1.

Esempio 15: Citotossicità di ADC anti-HER2 biparatopici esemplificativi nelle cellule HER2+

È stata misurata la capacità degli anticorpi di ADC anti-HER2 biparatopici esemplificativi (v6363, v7148 e v10553) di mediare la citotossicità cellulare nelle cellule HER2+. IgG umana coniugata a DM1 (v6249) è stata usata come controllo in alcuni casi. L'esperimento è stato eseguito nelle linee cellulari tumorali mammarie HER2+ JIMT-1, MCF7, MDA-MB-231, nella linea cellulare tumorale ovarica HER2+ SKOV3, e nella linea cellulare gastrica HER2+ NCI-N87. La citotossicità degli anticorpi di ADC anti-HER2 biparatopici esemplificativi nelle cellule HER2+ è stata valutata e confrontata con FSA-ADC anti-HER2 monospecifico (v6246) e i controlli FSA-ADC anti-HER2 + FSA anti-HER2 (v6246 + v4184). Il metodo è stato eseguito come descritto nell'Esempio 7 con le seguenti modifiche. Gli ADC anti-HER2 sono stati incubati con le cellule SKOV3 e JIMT-1 target (Figura 17A e B) per 24 ore, le cellule lavate, i terreni sostituiti e la sopravvivenza cellulare è stata valutata dopo 5 giorni di incubazione a 37 °C. Gli ADC anti-HER2 sono stati incubati con le cellule MCF7 target e cellule target MDA-MB-231 per 6 ore (Figura 17C e D), le cellule lavate, i terreni sostituiti e la sopravvivenza cellulare è stata valutata a 5 giorni di incubazione a 37 °C. Nella Figura 17E-G, gli ADC anti-HER2 sono stati incubati in modo continuo con le cellule target SKOV3, JIMT-1, NCI-N87 per 5 giorni. La vitalità cellulare è stata misurata come descritto nell'Esempio 7 usando AlamarBlue™ (Figura 17A-D) o Celltiter-Glo® (Figura 17E-G).

I risultati sono mostrati nelle Figure 17A-D e i dati sono riepilogati nelle Tabelle 15 e 16.

I risultati nella Figura 17A e nelle Tabelle 15 e 16 mostrano che l'ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v6363) è più citotossico in JIMT-1 rispetto a FSA-ADC anti-HER2 (v6246) e alla combinazione di FSA-ADC anti-HER2 + FSA anti-HER2 (v6246 + v4184). L'ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo aveva una EC₅₀ superiore che era approssimativamente 13 volte inferiore rispetto al controllo con FSA-ADC anti-HER2.

I risultati nella Figura 17B e nella Tabella 15 mostrano che ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v6363) è più citotossico in

SKOV3 rispetto a FSA-ADC anti-HER2 (v6246) e alla combinazione di FSA-ADC anti-HER2 + FSA anti-HER2 (v6246 + v4184). L'ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo aveva una EC₅₀ superiore che era approssimativamente 5 volte inferiore rispetto al controllo con FSA-ADC anti-HER2.

I risultati nella Figura 17C e nella Tabella 15 mostrano che l'ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v6363) è più citotossico in MCF7 rispetto a FSA-ADC anti-HER2 (v6246) e alla combinazione di FSA-ADC anti-HER2 + FSA anti-HER2 (v6246 + v4184). L'ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo aveva una EC₅₀ superiore, che era approssimativamente 2 volte inferiore rispetto al controllo con FSA-ADC anti-HER2.

I risultati nella Figura 17D e nella Tabella 15 mostrano che l'ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v6363) è più citotossico in MDA-MB-231 rispetto a FSA-ADC anti-HER2 (v6246) e alla combinazione di FSA-ADC anti-HER2 + FSA anti-HER2 (v6246 + v4184). L'ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo aveva una EC₅₀ superiore, che era approssimativamente 2 volte inferiore rispetto al controllo con FSA-ADC anti-HER2.

Tabella 15:

Variante anticorpo	EC ₅₀ (nM)			
	SKOV3	JIMT-1	MCF7	MDA-MB-231
v6246	0.9225	5.942	122.0	~1075
v6246 + 4184	3.146	12.68	~24432	136.4
v6363	0.1776	0.4443	58.55	141.0

I risultati nella Figura 17E e nella Tabella 16 mostrano che gli ADC biparatopici anti-HER2 esemplificativi (v6363, v7148 e v10553) sono più citotossici nelle cellule tumorali ovariche SKOV3 rispetto a FSA-ADC anti-HER2 (v6246). Gli ADC biparatopici anti-HER2 esemplificativi avevano valori EC₅₀ superiori che erano approssimativamente da 2 a 7 volte inferiori rispetto al controllo con FSA-ADC anti-HER2.

I risultati nella Figura 17F e nella Tabella 16 mostrano che gli ADC biparatopici anti-HER2 esemplificativi (v6363, v7148 e v10553) sono più citotossici nelle cellule tumorali mammarie JIMT-1 rispetto a FSA-ADC anti-HER2 (v6246). Gli ADC biparatopici anti-HER2 esemplificativi avevano valori EC₅₀ superiori che erano approssimativamente da 6 a 9 volte inferiori rispetto al controllo con FSA-ADC anti-HER2.

I risultati nella Figura 17G e nella Tabella 16 mostrano che gli ADC biparatopici anti-HER2 esemplificativi (v6363, v7148 e v10553) sono citotossici nelle cellule tumorali gastriche NCI-N87. Gli ADC biparatopici anti-HER2 esemplificativi hanno avuto valori EC₅₀ approssimativamente equivalenti rispetto al controllo con FSA-ADC anti-HER2.

Tabella 16:

Variante di anticorpo	EC ₅₀ (nM)		
	SKOV3	JIMT-1	NCI-N87
v6246	0.22	3.52	1.04
v6363	0.03	0.56	1.33
v7148	0.06	0.56	2.74
v10553	0.09	0.39	1.69

Questi risultati mostrano che gli ADC biparatopici anti-HER2 esemplificativi (v6363, v7148 e v10553) sono più citotossici rispetto al controllo con FSA-ADC anti-HER nelle cellule tumorali mammarie HER2 3+, 2+ e 1+. Questi risultati mostrano anche che gli ADC biparatopici anti-HER2 esemplificativi (v6363, v7148 e v10553) sono citotossici nelle cellule tumorali gastriche HER2 2/3+. Questi risultati sono coerenti con i risultati di internalizzazione presentati nell'Esempio 9.

Esempio 16: Effetto di un anticorpo anti-HER2 biparatopico in un modello di xenotrapianto di cellule di cancro ovarico umano

Il modello di xenotrapianto derivato da cellule di cancro ovarico umano stabilito SKOV3 è stato usato per valutare l'efficacia antitumorale di un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo.

Topi nudi atimici femmina sono stati inoculati con il tumore tramite l'inserzione di un frammento tumorale di 1 mm³ per via sottocutanea. I tumori sono stati monitorati finché hanno raggiunto un volume medio di 220 mm³; successivamente, gli animali sono stati randomizzati in 3 gruppi di trattamento: controllo con IgG, FSA anti-HER2 (v506) e anticorpo anti-HER2 biparatopico (v5019).

Quindici animali sono stati inclusi in ciascun gruppo. Il dosaggio per ciascun gruppo è il seguente:

A) il controllo con IgG è stato dosato per via endovenosa con una dose di carico di 30 mg/kg il giorno di studio 1, in seguito con dosi di mantenimento di 20 mg/kg due volte a settimana fino al giorno di studio 39.

B) FSA anti-HER2 (v506) è stato dosato per via endovenosa con una dose di carico di 15 mg/kg il giorno di studio 1, in seguito con dosi di mantenimento di 10 mg/kg due volte a settimana fino al giorno di studio 18. I giorni dal 22 al 39, 5 mg/kg di FSA anti-HER2 sono stati dosati per via endovenosa due volte a settimana. FSA anti-HER2 (v4184) è stato dosato simultaneamente a 5 mg/kg per via intraperitoneale due volte a settimana.

C) anticorpo anti-HER2 biparatopico è stato dosato per via endovenosa con una dose di carico di 15 mg/kg sul giorno di studio 1, in seguito con dosi di mantenimento di 10 mg/kg due volte a settimana fino al giorno di studio 39.

Il volume del tumore è stato misurato due volte a settimana nell'arco dello studio, il numero di responder e la sopravvivenza mediana

sono stati valutati il giorno 22. I risultati sono mostrati nella Figura 18 e nella Tabella 17.

L'FSA anti-HER2 biparatopico e anti-HER2 ha dimostrato un'inibizione della crescita tumorale superiore rispetto al controllo con IgG. L'anticorpo anti-HER2 biparatopico ha indotto un'inibizione della crescita tumorale superiore rispetto alla combinazione di FSA anti-HER2 (Figura 18A). L'anticorpo anti-HER2 biparatopico è stato associato a un aumento del numero di tumori rispondenti rispetto a FSA anti-HER2 v506 il giorno 22 (rispettivamente 11 e 5) (Tabella 17). L'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo e FSA anti-HER2 hanno dimostrato una sopravvivenza superiore rispetto al controllo con IgG. L'anticorpo anti-HER2 biparatopico ha avuto una sopravvivenza mediana superiore (61 giorni) rispetto a FSA anti-HER2 (36 giorni) (Figura 18B e Tabella 17). Il giorno di studio 22, un secondo FSA anti-HER2 (v4184) è stato aggiunto in combinazione a FSA anti-HER2 (v506). La combinazione di due FSA anti-HER2 ha indotto un'ulteriore inibizione della crescita tumorale rispetto a FSA anti-HER2 (v506) da solo.

Tabella 17:

n=15, Giorno 22	IgG	v506	v5019
TV medio (mm ³) (% di cambiamento dal basale)	1908 (+766%)	1291 (+486%)	697 (+217%)
% TGI	0	32	63
Responder (TV <50% del controllo)	0/15	5/15	11/15
Sopravvivenza mediana (giorni)	22	36	61

Esempio 17: Effetto di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC) anti-HER2 biparatopico in un modello di xenotrapianto di linea cellulare di cancro ovarico umano

Il modello di xenotrapianto ricavato da cellule di cancro ovarico umano stabilito SKOV3 è stato usato per valutare l'efficacia antitumorale di un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo coniugato a DM1 (v6363).

Topi nudi atimici femmina sono stati inoculati con il tumore tramite l'inserzione di un frammento tumorale di 1 mm³ per via sottocutanea. I tumori sono stati monitorati finché hanno raggiunto un volume medio di 220 mm³; successivamente, gli animali sono stati randomizzati in 3 gruppi di trattamento: Controllo con IgG, FSA-ADC anti-HER2 e un ADC anti-HER2 biparatopico.

Quindici animali sono stati inclusi in ciascun gruppo. Il dosaggio per ciascun gruppo è il seguente:

A) il controllo con IgG è stato dosato per via endovenosa con una dose di carico di 30 mg/kg il giorno di studio 1, in seguito con dosi di mantenimento di 20 mg/kg due volte a settimana fino al giorno di studio 39.

B) FSA-ADC anti-HER2 (v6246) è stato dosato per via endovenosa con una dose di carico di 10 mg/kg il giorno di studio 1, in seguito

con una dose di mantenimento di 5 mg/kg il giorno 15 e 29.

C) l'ADC anticorpo anti-HER2 biparatopico (v6363) è stato dosato per via endovenosa con una dose di carico di 10 mg/kg il giorno di studio 1, in seguito con una dose di mantenimento di 5 mg/kg il giorno 15 e 29.

Il volume del tumore è stato misurato durante tutto lo studio e il numero di responder e la sopravvivenza mediana sono stati valutati il giorno 22. I risultati sono mostrati nella Figura 19. Un riepilogo dei risultati è mostrato nella Tabella 18.

L'ADC anti-HER2 biparatopico e FSA-ADC anti-HER2 hanno inibito la crescita del tumore in modo migliore rispetto al controllo con IgG (Figura 19A e Tabella 18). L'ADC anti-HER2 biparatopico ha inibito la crescita del tumore in misura maggiore rispetto a FSA-ADC anti-HER2. Il gruppo ADC anti-HER2 biparatopico è stato associato a un aumento del numero di tumori risponditori rispetto a FSA-ADC anti-HER2 (rispettivamente 11 e 9). I gruppi ADC anti-HER2 biparatopici e FSA-ADC anti-HER2 hanno dimostrato una sopravvivenza superiore rispetto al controllo con IgG (Figura 19B e Tabella 18). Il gruppo di anticorpi anti-HER2 biparatopici ha dimostrato una sopravvivenza mediana di 61 giorni rispetto a FSA-ADC anti-HER2 che ha avuto una sopravvivenza mediana di 36 giorni (Figura 19B e Tabella 18).

Tabella 18:

n=15, Giorno 22	IgG	v6246	v6363
TV medio (mm ³) (% di cambiamento dal basale)	1908 (+766%)	873 (+297%)	632 (+187%)
% TGI	0	54%	67%
Responder (TV <50% del controllo)	0/15	9/15	11/15
Sopravvivenza mediana (giorni)	22	36	61

Esempio 18: Effetto di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC) anti-HER2 biparatopico in un modello di xenotrapianto di cellule primarie umane (HBCx-13b)

Il modello di xenotrapianto ricavato da paziente resistente a trastuzumab di cancro mammario umano, HBCx-13B, è stato usato per valutare l'efficacia antitumorale di un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo coniugato a DM1.

Topi nudi atimici femmina sono stati inoculati con il tumore tramite l'inserzione di un frammento tumorale di 20 mm³ per via sottocutanea. I tumori sono stati monitorati finché hanno raggiunto un volume medio di 100 mm³; gli animali sono stati successivamente randomizzati in 3 gruppi di trattamento: FSA anti-HER2 (v506), FSA-ADC anti-HER2 (v6246) e ADC anti-HER2 biparatopico (v6363). Sette animali sono stati inclusi in ciascun gruppo. Il dosaggio per ciascun gruppo era il seguente:

A) FSA anti-HER2 è stato somministrato per via endovenosa con una dose di carico di 15 mg/kg il giorno di studio 1 e dosi di mantenimento

di 10 mg/kg somministrate i giorni di studio 4, 8, 11, 15, 18, 22 e 25.

B) FSA-ADC anti-HER2 è stato somministrato per via endovenosa con una dose di carico di 10 mg/kg il giorno di studio 1, successivamente con una dose di mantenimento di 5 mg/kg il giorno 22.

C) l'ADC anticorpo anti-HER2 biparatopico è stato dosato per via endovenosa con una dose di carico di 10 mg/kg il giorno di studio 1, successivamente con una dose di mantenimento di 5 mg/kg il giorno 22.

Il volume del tumore è stato misurato durante tutto lo studio, e i parametri di volume medio del tumore, risposta completa e malattia residua zero sono stati valutati il Giorno 50. I risultati sono mostrati nella Figura 20. Un riepilogo dei risultati è mostrato nella Tabella 19.

L'ADC anti-HER2 biparatopico e FSA-ADC anti-HER2 hanno dimostrato un'inibizione della crescita tumorale maggiore rispetto a un FSA anti-HER2 (v506). L'ADC anti-HER2 biparatopico ha inibito la crescita tumorale meglio di FSA-ADC anti-HER2. Il gruppo ADC anti-HER2 biparatopico rispetto al gruppo FSA-ADC anti-HER2 è stato associato a un aumento del numero di tumori che mostrano risposte complete (una diminuzione al di sotto del basale superiore al 10%), rispettivamente 7 e 4, e che mostrano malattia residua zero, rispettivamente 5 e 2.

Tabella 19:

n=7, Giorno 50	v506	v6246	v6363
TV medio (mm ³) (% di cambiamento dal basale)	1149 (+1018%)	262 (+153%)	26 (-75%)
% TGI	0%	77%	98%
Risposta completa (regressione dal basale >10%)	0	4/7	7/7
Malattia residua zero (TV < 20 mm ³)	0	2/7	5/7

Esempio 19: Effetto di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC) anti-HER2 biparatopico in un modello di xenotrapianto di cellule primarie umane (T226)

Il modello di xenotrapianto ricavato da paziente resistente a trastuzumab da cancro mammario umano, T226, è stato usato per valutare l'efficacia antitumorale di un ADC anti-HER2 biparatopico esemplificativo.

Topi nudi atimici femmina sono stati inoculati con il tumore tramite l'inserzione di un frammento tumorale di 20 mm³ per via sottocutanea. I tumori sono stati monitorati finché hanno raggiunto un volume medio di 100 mm³; gli animali sono stati successivamente randomizzati in 4 gruppi di trattamento: controllo con IgG (n=15), FSA anti-HER2 (v506; n=15), FSA-ADC anti-HER2 (v6246; n=16) e il coniugato ADC anti-HER2 biparatopico (v6363; n=16). Il dosaggio per ciascun gruppo era il seguente:

A) il controllo con IgG è stato dosato per via endovenosa con una dose di carico di 15 mg/kg il giorno di studio 1 e dosi di mantenimento

di 10 mg/kg somministrate i giorni di studio 4, 8, 11, 15, 18, 22 e 25

B) FSA anti-HER2 è stato dosato per via endovenosa con una dose di carico di 15 mg/kg il giorno di studio 1 e dosi di mantenimento di 10 mg/kg somministrate i giorni di studio 4, 8, 11, 15, 18, 22 e 25

C) FSA-ADC anti-HER2 è stato dosato per via endovenosa con 5 mg/kg i giorni di studio 1 e 15

D) Il coniugato ADC anti-HER2 biparatopico è stato dosato per via endovenosa con 5 mg/kg i giorni di studio 1 e 15.

Il volume del tumore è stato misurato durante tutto il corso dello studio e i parametri del volume medio del tumore e della risposta completa sono stati valutati il giorno 31. I risultati sono mostrati nella Figura 21. Un riepilogo dei risultati è mostrato nella Tabella 20.

L'ADC anti-HER2-ADC e FSA-ADC anti-HER2 hanno dimostrato un'inibizione della crescita tumorale migliore rispetto a FSA anti-HER2 (v506) e al controllo con IgG. L'ADC anti-HER2 biparatopico esemplificativo ha indotto un'inibizione della crescita tumorale equivalente e una regressione dal basale completa rispetto a FSA-ADC anti-HER2 (Figura 21 e Tabella 20) in questo modello.

Tabella 20:

Giorno 31	IgG (n=13)	v506 (n=13)	v6246 (n=16)	v6363 (n=16)
TV medio (mm ³) (% di cambiamento dal basale)	1797 (+1728%)	1611 (+1573)	422 (+332%)	572 (+483%)
% TGI (vs hIgG)	0%	11%	77%	68%
Risposta completa (regressione dal basale >10%)	0/13	0/14	1/16	1/16

Esempio 20: Effetto di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC) anti-HER2 biparatopico in un modello di xenotrapianto di cellule umane primarie (HBCx-5)

Il modello di xenotrapianto ricavato da paziente resistente a trastuzumab da cancro mammario umano, HBCx-5 (carcinoma duttale invasivo, luminale B), è stato usato per valutare l'efficacia antitumorale di un ADC anti-HER2 biparatopico esemplificativo.

Topi nudi atimici femmina sono stati inoculati con il tumore tramite l'inserzione di un frammento tumorale di 20 mm³ per via sottocutanea. I tumori sono stati monitorati finché non hanno raggiunto un volume medio di 100 mm³; successivamente, gli animali sono stati randomizzati in 4 gruppi di trattamento: controllo con IgG (n=15), FSA anti-HER2 (v506; n=15), FSA-ADC anti-HER2 (v6246; n=16) e ADC anti-HER2 biparatopico (v6363; n=16). Il dosaggio per ciascun gruppo era il seguente:

A) il controllo con IgG è stato dosato per via endovenosa con una dose di carico di 15 mg/kg il giorno di studio 1 e dosi di mantenimento di 10 mg/kg somministrate i giorni di studio 4, 8, 11, 15, 18, 22 e 25

B) FSA anti-HER2 è stato dosato per via endovenosa con una dose di carico di 15 mg/kg il giorno di studio 1 e dosi di mantenimento di 10 mg/kg somministrate i giorni di studio 4, 8, 11, 15, 18, 22 e 25

C) FSA-ADC anti-HER2 è stato dosato per via endovenosa con 10 mg/kg i giorni di studio 1, 15, 22, 29, 36

D) ADC anti-HER2 biparatopico è stato dosato per via endovenosa con 10 mg/kg i giorni di studio 1, 15, 22, 29, 36.

Il volume del tumore è stato misurato durante tutto il corso dello studio e i parametri di volume medio del tumore, rapporto T/C, numero di responder, risposta completa e malattia residuo zero sono stati valutati il giorno 43. I risultati sono mostrati nella Figura 22. Un riepilogo dei risultati è mostrato nella Tabella 21.

L'ADC anti-HER2 biparatopico e FSA-ADC anti-HER2 hanno dimostrato un'inibizione della crescita tumorale migliore rispetto a FSA anti-HER2 (v506) e al controllo con IgG. L'ADC anti-HER2 biparatopico esemplificativo ha indotto un'inibizione della crescita tumorale equivalente e ha avuto un numero aumentato di responder rispetto a FSA-ADC anti-HER2 (Figura 22 e Tabella 21) nel modello di xenotrapianto di cancro mammario umano HBCx-5 resistente a trastuzumab.

Tabella 21:

Giorno 43	IgG (n=4)	Herceptin (n=5)	T-DM1 (n=7)	6363 (n=7)
TV medio (mm ³) (% di cambiamento dal basale)	922 (+693%)	815 (+598%)	193 (+65%)	241 (+106%)
rapporto T/C (IgG)	1	0.88	0.21	0.26
Responder (TV < 50% del controllo)	0/4	1/5	6/7	7/7
Risposta completa (regressione dal basale >10%)	0/4	0/5	1/7	0/7
Malattia residua zero (TV < 20 mm ³)	0/4	0/5	0/7	0/7

Esempio 21: Effetto di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC) anti-HER2 biparatopico su tumori resistenti a trattamento anti-HER2 in un modello di xenotrapianto di linea cellulare umana (SKOV3)

Il modello di xenotrapianto ricavato da cellule di cancro ovarico umano stabilito SKOV3, descritto nell'Esempio 17, è stato usato per valutare l'efficacia antitumorale di un ADC anti-HER2 biparatopico esemplificativo in tumori resistenti al trattamento con anti-HER2.

I metodi sono stati seguiti come descritto nell'Esempio 17 con le seguenti modifiche. Una coorte di animali è stata trattata con un anticorpo anti-HER2 per via endovenosa con 15 mg/kg il giorno di studio 1 e con 10 mg/kg i giorni 4, 8, 15; tuttavia, questo trattamento non è riuscito a dimostrare una risposta efficace entro il giorno 15 in questo modello. In seguito, questo gruppo di trattamento è stato convertito nel trattamento con il coniugato farmaco-anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v6363) ed è stato dosato con 5 mg/kg i giorni di studio 19 e 27 e con 15 mg/kg i giorni di studio 34, 41 e 48.

Il volume del tumore è stato misurato due volte a settimana durante tutto il corso dell'esperimento.

I risultati sono mostrati nella Figura 23 e indicano che il gruppo trattato con ADC anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v6363) ha mostrato una regressione del tumore a un volume tumorale medio inferiore al volume medio iniziale di 220 mm³.

Esempio 22: Effetto di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC) anti-HER2 biparatopico su tumori resistenti a trattamento con anti-HER2 nel modello di xenotrapianto di cellule primarie umane (HBCx-13b)

Il modello di xenotrapianto ricavato da paziente resistente a trastuzumab di cancro mammario umano, HBCx-13B, è stato usato per valutare l'efficacia antitumorale di un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo coniugato a DM1.

I metodi sono stati seguiti come descritto nell'Esempio 18 con le seguenti modifiche. Una coorte di animali è stata trattata con un anticorpo bi-specifico che individua la famiglia anti-ErbB per via endovenosa con 15 mg/kg il giorno di studio 1 e con 10 mg/kg i giorni 4, 8, 15, 18, 22 e 25; tuttavia, questo trattamento non ha dimostrato una risposta efficace. Questo gruppo di trattamento è stato in seguito convertito nel trattamento con il coniugato farmaco-anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v6363) ed è stato dosato con 10 mg/kg i giorni 31, 52 e con 5 mg/kg il giorno 45. Il volume del tumore è stato misurato per tutta la durata dello studio.

I risultati sono mostrati nella Figura 24. Questi risultati mostrano che l'ADC anti-HER2 biparatopico esemplificativo (v6363) ha impedito la progressione del tumore. Dalla prima dose il giorno 57, il volume del tumore del gruppo trattato con v6363 è aumentato di meno del 2%, mentre nello stesso intervallo il gruppo trattato con v506 è cresciuto di oltre il 110%.

Esempio 23: Analisi del contenuto di fucosio di un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo

L'analisi dei glicopeptidi è stata eseguita per quantificare il contenuto di fucosio del glicano N-legato degli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi (v5019, v7091 e v10000).

L'analisi dei glicopeptidi è stata eseguita come segue. I campioni di anticorpo sono stati ridotti con 10 mM di DTT a 56 °C per 1 ora e alchilati con 55 mM di iodoacetammide a RT per 1 ora e digeriti in soluzione con tripsina in 50 mM di bicarbonato di ammonio per una durata di tempo pari a una notte a 37 °C. I digeriti triptici sono stati analizzati mediante nanoLC-MS/MS su QToF-Ultima. Il database NCBI è stato consultato con Mascot per identificare le sequenze proteiche. MaxEnt3 (MassLynx) è stato usato per effettuare la deconvoluzione degli ioni glicopeptidici e quantificare le glicoforme differenti.

Un riepilogo dei risultati dell'analisi dei glicopeptidi è nella Tabella 22. I glicani N-legati degli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi (v5019, v7091 e v10000) sono fucosilati approssimativamente al 90% (10% di glicani N-legati senza fucosio). I glicani N-legati di

FSA anti-HER2 monospecifico (v506) sono fucosilati approssimativamente al 96% (4% di glicani N-legati senza fucosio) e Herceptin® è approssimativamente fucosilato all'87% (4% di glicani N-legati senza fucosio).

Tabella 22: Analisi dei glicopeptidi N-legati a Fc

Variante anticorpo	% in media dei glicopeptidi osservati con fucosio	% in media dei glicopeptidi osservati senza fucosio	n
v506	96.4	3.6	5
Herceptin®	86.5	13.4	4
v5019	90.5	9.4	6
v7091	89.9	26.9	3
v10000	89.2	10.7	5

Questi risultati mostrano che gli anticorpi anti-HER2 biparatopici (con un Fc eterodimerico), espressi transitoriamente in cellule CHO, hanno un contenuto di fucosio approssimativamente superiore del 3% in N-glicano rispetto a Herceptin® commerciale. FSA anti-HER2 omodimerico (v506), espresso transitoriamente in cellule CHO, ha il contenuto di fucosio massimo approssimativamente del 96%.

Esempio 24: Stabilità termica di un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo

La stabilità termica degli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi (v5019, v7091 e v10000) e ADC (v6363, v7148 e v10533) è stata misurata mediante DSC come descritto di seguito.

Il DSC è stato eseguito in MicroCai™ VP-Capillary DSC (GE Healthcare) usando un campione di proteina purificata (anticorpi biparatopici anti-HER2 e ADC biparatopici anti-HER2) regolato a circa 0,3 mg/ml in PBS. Il campione è stato scansionato da 20 a 100 °C a una velocità di 60 °C/ora, con bassa retroazione, filtro di 8 sec, preTstat di 5 min e pressione di azoto di 70 psi. Il termogramma risultante è stato analizzato usando il software Origin 7.

I risultati di stabilità termica degli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi (v5019, v7091 e v10000) sono mostrati nella Figura 25A-C. La Figura 25A mostra il termogramma per v5019; Fc e catena A Fab di ciascuno hanno una T_m di 75° Celsius e la catena B scFv di 5019 ha una T_m di 69° Celsius. La Figura 25B mostra il termogramma per v10000; il dominio CH3 di Fc ha una T_m di 82° Celsius, la catena A Fab ha una T_m di 76,5° Celsius e catena B scFv ha una T_m di 69,5° Celsius. La Figura 25C mostra il termogramma per v7091; il dominio CH3 di Fc ha una T_m di 82° Celsius, la catena A Fab ha una T_m di 76,7° Celsius e la catena B scFv ha una T_m di 69,5° Celsius.

I risultati di stabilità termica degli ADC anti-HER2 biparatopici esemplificativi (v6363, v7148 e v10533) sono mostrati nella Figura 26A-C. La Figura 26A mostra il termogramma per v6363; il Fc ha una T_m di 75° Celsius e la catena A Fab e il dominio CH3 di Fc hanno una T_m di 75°

Celsius. La catena B scFv di 6363 ha una T_m di 69° Celsius. La Figura 26B mostra il termogramma per v10553; il dominio CH3 di Fc ha una T_m di 83° Celsius, catena A Fab ha una T_m di 75,7° Celsius e la catena B scFv ha una T_m di 66,2° Celsius. La Figura 26C mostra il termogramma per v7148; il dominio CH3 di Fc ha una T_m di 82,6° Celsius, la catena A Fab ha una T_m di 74,8° Celsius e la catena B scFv ha una T_m di 66,6° Celsius.

Gli anticorpi biparatopici esemplificativi e gli ADC hanno una stabilità termica paragonabile a quella dell'IgG wild-type.

Esempio 25: Capacità di un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo di suscitare ADCC di cellule tumorali mammarie che esprimono livelli variabili di HER2

È stata esaminata la capacità dell'anticorpo biparatopico esemplificativo (v5019) di suscitare ADCC dose-dipendente di linee cellulari di cancro mammario HER2 positivo 3+, 2+ e 0/1+ che esprimono HER2 (triplo negativo). Gli esperimenti di ADCC sono stati eseguiti come descritto nell'Esempio 11, con l'eccezione che il rapporto tra cellule effettrici NK e cellule target è rimasto costante a 5:1.

I risultati di ADCC sono mostrati nella Figura 27 e nella Tabella 23. I risultati nella Figura 27A-C mostrano che l'anticorpo biparatopico esemplificativo (v5019) suscita una lisi cellulare massima approssimativamente da 1,2 a 1,3 volte maggiore delle cellule di cancro mammario HER2 positivo 3+, 2+ e 0/1+ che esprimono HER2 rispetto a Herceptin®. I risultati mostrano inoltre che v5019 (90% N-glicani con fucosio) media in modo più efficace l'ADCC delle cellule di cancro mammario HER2 positivo 3+, 2+ e 0/1+ che esprimono HER2 nonostante abbia un contenuto di fucosio approssimativamente superiore del 4% negli N-glicani (risultante in un'affinità di legame inferiore a CD16 sulle cellule NK) rispetto a Herceptin® (86% N-glicani con fucosio; Esempio 23). L'uccisione di cellule target superiore suscitata da v5019 è presumibilmente dovuta a una decorazione aumentata delle cellule tumorali come descritto nell'Esempio 6.

Tabella 23: ADCC di cellule di cancro mammario HER2 3+, 2+ e 0/1+ esperimenti HER2

Trattamento	SKBr3 HER2 3+		JIMT-1 HER2 2+		MDA-MB-231 HER2 0/1+	
	% massima di lisi di cellule target	EC ₅₀ (nM)	% massima di lisi di cellule target	EC ₅₀ (nM)	% massima di lisi di cellule target	EC ₅₀ (nM)
v5019	30	~0.9	60	0.001	53	0.9
Herceptin®	23	~0.9	51	0.002	44	0.9

I risultati di ADCC nella Figura 27D mostrano che gli anticorpi biparatopici esemplificativi (v7091 e v10000) suscitano una lisi cellulare massima simile rispetto a Herceptin® nella linea cellulare WI-38 che esprime HER2 al basale. I risultati di ADCC supportano i dati di legame cellulare (Esempio 6), mostrando che una soglia per legame aumentato e ADCC si verifica quando i livelli del recettore HER2 sono superiori a 10.000 HER2/cellula. In base a questi dati, può essere previsto che gli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi hanno un legame di superficie cellulare

aumentato e ADCC delle cellule tumorali HER2 3+, 2+ e 1+, tuttavia, non hanno un legame di superficie cellulare aumentato e ADCC delle cellule non tumorali che esprimono livelli basali del recettore HER2 a circa 10.000 recettori o meno.

Esempio 26: Effetto di afucosilazione di anticorpo su ADCC

È stata esaminata la capacità degli anticorpi biparatopici esemplificativi afucosilati (v5019-afuco, 10000-afuco) di suscitare ADCC dose-dipendente delle linee cellulari di cancro mammario HER2 positivo 2/3+, 2+ e 0/1+ che esprimono HER2 (triplo-negativo). Gli esperimenti di ADCC sono stati eseguiti come descritto nell'Esempio 11, in cellule SKOV3, cellule MDA-MB-231 e cellule ZR75-1, con l'eccezione che è stato usato un rapporto costante di cellule effettrici NK o cellule effettrici PBMC e cellule target (E:T) di 5:1. Gli anticorpi biparatopici esemplificativi afucosilati sono stati prodotti transitoriamente in cellule CHO come descritto nell'Esempio 1, usando l'enzima RMD espresso transitoriamente come descritto in von Horsten et al. 2010 Glycobiology 20:1607-1618. Il contenuto di fucosio di v5019-afuco e v10000-afuco è stato misurato come descritto nell'Esempio 23 ed è stato determinato che è fucosilato a meno del 2% (dati non mostrati). I dati che usano cellule effettrici NK sono mostrati nella Figura 28A-B, mentre i dati che usano PBMC sono mostrati nella Figura 28C.

La Figura 28A, la Figura 28B e la Tabella 24 mostrano che v5019 afucosilato (v5019-afuco) suscita l'ADCC di cellule di cancro mammario che esprimono HER 2/3+ e 0/1+ HER2 con una lisi cellulare massima approssimativamente da 1,5 a 1,7 volte superiore rispetto a Herceptin®.

Tabella 24: ADCC di cellule di cancro mammario che esprimono HER2 2/3+ e HER2 al basale (triplo-negativo)

Trattamento	SKOV3 HER2 2+/3+		MDA-MD-231 HER2 0/1+	
	% massima di lisi di cellule target	EC ₅₀ (nM)	% massima di lisi di cellule target	EC ₅₀ (nM)
v5019-afucosilato	24	~0.6	58	~0.6
Herceptin®	14	~0.6	40	~0.3

I risultati nella Figura 28C e nella Tabella 25 mostrano che v10000 suscita ADCC delle cellule di cancro mammario HER2 2+ ZR-75-1 con una lisi cellulare massima approssimativamente 1,3 volte maggiore rispetto a Herceptin®, e v10000-afuco suscita una lisi cellulare massima approssimativamente 1,5 volte maggiore rispetto a Herceptin®.

Tabella 25: ADCC di cellule di cancro mammario HER2 2/3+

Trattamento	ZR-751 HER2 2+	
	% massima di lisi di cellule target	EC ₅₀ (nM)
v10000	28	~0.06
v10000-afucosilato	32	~0.7

Herceptin®	21	~0.5
------------	----	------

I risultati ADCC mostrano che gli anticorpi biparatopici afucosilati esemplificativi (v5019-afuco, v10000-afuco) suscitano approssimativamente una lisi cellulare massima approssimativamente del 15-25% maggiore rispetto agli anticorpi fucosilati (v5019 Esempio 25, v10000), quando Herceptin® è usato come parametro di riferimento. Questi risultati mostrano che ridurre il contenuto di fucosio di N-glicano di Fc ha come risultato una lisi cellulare massima aumentata mediante ADCC.

Esempio 27: Capacità dell'anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo di inibire la crescita delle cellule di cancro mammario HER2 3+ in presenza di ligandi esogeni stimolatori della crescita (EGF e HRG)

È stata esaminata la capacità di 5019 di inibire la crescita delle cellule di cancro mammario HER2 3+ in presenza di ligandi esogeni stimolatori della crescita (EGF e HRG).

Gli anticorpi di test e il ligando esogeno (10 ng/ml HRG o 50 ng/ml EGF) sono stati aggiunti alle cellule target BT-474 HER2 3+ in triplicato e incubati per 5 giorni a 37 °C. La vitalità cellulare è stata misurata usando AlamarBlue™ (37 °C per 2 ore), assorbanza letta a 530/580 nm. I dati sono stati normalizzati rispetto al controllo non trattato e l'analisi è stata eseguita usando GraphPad Prism.

I risultati sono mostrati nella Figura 29 e nella Tabella 26. I risultati mostrano che l'anticorpo biparatopico esemplificativo v5019 inibisce la crescita delle cellule di cancro mammario HER2 3+ in assenza di ligando stimolante la crescita (70% di inibizione), nonché in presenza di EGF (40% di inibizione) o HRG (~10% di inibizione). L'FSA monospecifico anti-HER2 (v506) non blocca la crescita delle cellule tumorali indotta da EGF o HRG tramite altri recettori di erbB EGFR e HER3. v5019 è superiore a v506 nell'inibire la dimerizzazione e la crescita dipendenti da HER2 e ligando tramite altri recettori erbB di accompagnamento.

Tabella 26: Inibizione della crescita di cellule cancerose HER2 3+

Trattamento	% di sopravvivenza		
	Anticorpo da solo	+ EGF	+ HRG
Mock	100	122	110
v506	41	114	129
v5019	31	56	92

Questi risultati mostrano che l'anticorpo biparatopico esemplificativo è in grado di ridurre la crescita dipendente dal ligando delle cellule HER2+, presumibilmente a causa del legame del braccio di catena A Fab anti-ECD2 e del successivo bloccaggio dell'omodimerizzazione ed eterodimerizzazione del recettore stimolata dal ligando, e segnalazione di erbB.

Esempio 28: Effetto di un anticorpo anti-HER2 biparatopico in un modello di xenotrapianto di cancro mammario metastatico derivato da paziente HER2 3+ (PDX) resistente a Trastuzumab e a chemioterapia, di carcinoma mammario duttale invasivo

Il modello di xenotrapianto derivato da paziente HER2 3+ (ER-PR negativo) da cancro mammario umano duttale invasivo, HBCx-13B, è stato usato per valutare l'efficacia antitumorale di un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo, v7187. v7187 è una versione afucosilata di v5019. Il modello è resistente a trastuzumab come agente singolo, alla combinazione di trastuzumab e pertuzumab (si veda l'esempio 31), capecitabina, docetaxel e adriamicina/ciclofosfamide.

Topi nudi atimici femmina sono stati inoculati per via sottocutanea con un frammento tumorale di 20 mm³. In seguito, i tumori sono stati monitorati finché non hanno raggiunto un volume medio di 140 mm³. In seguito, gli animali sono stati randomizzati in 2 gruppi di trattamento: controllo con veicolo e v7187 con otto animali in ciascun gruppo. Il dosaggio IV era il seguente. Il controllo con veicolo è stato trattato per via endovenosa con 5 ml/kg di tampone di formulazione due volte a settimana fino al giorno di studio 43. v7187 è stato dosato per via endovenosa con 10 mg/kg due volte a settimana fino al giorno di studio 43. Il volume del tumore è stato misurato durante tutto lo studio e altri parametri sono stati valutati il giorno 43 come mostrato nella Tabella 27.

I risultati sono mostrati nella Figura 30 e nella Tabella 27. I risultati mostrano che i tumori trattati con il controllo con veicolo hanno mostrato una progressione continua e hanno superato i 1600 mm³ entro il giorno di studio 43. I topi trattati con v7187 hanno mostrato un'inibizione della crescita tumorale significativamente maggiore (T/C - 0,44) con un volume tumorale medio di 740 mm³ il giorno 43. v7187 ha indotto risposte in 5/8 tumori con un unico tumore che ha mostrato una regressione completa con malattia residua zero il giorno di studio 43. Gli animali trattati con v7187 hanno avuto un tasso di risposta superiore con 5/8 tumori che hanno risposto alla terapia rispetto a 0/8 topi trattati con il controllo con veicolo. In aggiunta, il trattamento con v7187 ha ritardato sensibilmente la progressione tumorale rispetto al controllo con veicolo con tempi di raddoppiamento rispettivamente di 19 e 11 giorni.

Tabella 27:

Risposta tumorale		Veicolo	V7087
Giorno 43	TV medio (mm ³) (% cambiamento dal basale)	1683 (+1079%)	740 (+422%)
	rapporto T/C	1	0,44
	Responder (TV < 50% del controllo)	0/8	5/8
	PR (regressione dal basale >10%)	0/8	1/8
	ZRD (TV < 20 mm ³)	0/8	1/8
Tempo alla progressione	Tempo di raddoppiamento (giorni)	11	19

Questi dati mostrano che (v7187) biparatopico anti-HER2 esemplificativo è efficace in un modello di xenotrapianto di tumore mammario metastatico HER2 3+ resistente a Trastuzumab+Pertuzumab. Il trattamento V7187 ha un alto tasso di risposta e può compromettere sensibilmente la progressione del tumore nei cancri mammari HER2 3+ resistenti al trattamento standard di cura.

Esempio 29: Valutazione del legame di ADC anti-HER2 biparatopico alle linee cellulari tumorali HER2+

La capacità degli ADC anti-HER2 biparatopici esemplificativi di legarsi e saturare le linee cellulari tumorali mammarie e ovariche positive a HER2 3+, 2+ è stata analizzata mediante FACS come descritto nell'Esempio 6.

I dati sono mostrati nella Figura 31. La Figura 31A mostra il legame di v6363 alle linee cellulari tumorali SKOV3 con un Bmax (MFI) approssimativamente 2,0 volte maggiore rispetto a T-DM1 (v6246) alle concentrazioni di saturazione. La Figura 31B mostra il legame di v6363 alle linee cellulari tumorali JIMT-1 con un Bmax (MFI) approssimativamente 1,6 volte maggiore rispetto a T-DM1 (v6246) a concentrazioni di saturazione. Questi dati mostrano che v6363 (ADC) ha proprietà di legame delle cellule tumorali simili di legame aumentato alla superficie cellulare rispetto all'anticorpo v5019 non coniugato progenitore (Esempio 6). La coniugazione di v5019 con SMCC-DM1 (v6363) non altera le proprietà di legame all'antigene dell'anticorpo.

Il saggio di legame FACS è stato ripetuto per includere il confronto diretto con gli anticorpi biparatopici esemplificativi (v5019, v7091 e v10000) e gli ADC (v6363, v7148 e v10553). I dati sono mostrati nella Figura 31C e nella Figura 31D. Gli ADC anti-HER2 biparatopici esemplificativi (v6363, v7148 e v10553) hanno una saturazione della superficie cellulare (Bmax) equivalente rispetto agli anticorpi biparatopici non marcati (v5019, v7091 e v10000).

Questi dati mostrano che la coniugazione degli anticorpi biparatopici esemplificativi (v5019, v7091 e v10000) con SMCC-DM1 non altera le proprietà di legame. Gli ADC anti-HER2 biparatopici anti-HER2 esemplificativi (v6363, v7148 e v10553) hanno un legame della superficie cellulare aumentato approssimativamente di 1,5 volte (o maggiore) rispetto a un ADC anti-HER2 monospecifico (v6246, T-DM1).

Esempio 30: Inibizione della crescita tumorale dose-dipendente di un ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo in un modello di xenotrapianto derivato da paziente HER2 3+ (ER-PR negativo)

Il modello di xenotrapianto derivato da paziente HER2 3+ (ER-PR negativo) da cancro mammario umano duttale invasivo, HBCx-13B, è stato usato per valutare l'efficacia antitumorale di un ADC anti-HER2 biparatopico esemplificativo, v6363. Il modello è resistente a trastuzumab come agente singolo, alla combinazione di trastuzumab e pertuzumab (si veda l'esempio 31), capecitabina, docetaxel e adriamicina/ciclofosfamide.

Topi nudi atimici femmina sono stati inoculati con il tumore tramite l'inserzione sottocutanea di un frammento tumorale di 20 mm³. I

tumori sono stati monitorati finché non hanno raggiunto un volume medio di 160 mm³; gli animali sono stati successivamente randomizzati in 5 gruppi di trattamento: controllo con IgG umana non specifica e 4 dosi crescenti di v6363. 8-10 animali sono stati inclusi in ciascun gruppo. Il dosaggio per ciascun gruppo era il seguente. Il controllo con IgG è stato somministrato per via endovenosa con 10 mg/kg due volte a settimana fino al giorno di studio 29. v6363 è stato somministrato per via endovenosa con 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg i giorni di studio 1, 15 e 29. Il volume del tumore è stato valutato durante tutto lo studio e i parametri sono stati valutati come indicato nella Tabella 29.

I risultati sono mostrati nella Figura 32 e nella Tabella 28. Questi risultati mostrano che l'ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v6363) ha mediato l'inibizione della crescita tumorale dose dipendente nel modello PDX HBCx-13b resistente a Trastuzumab (Figura 32A). In aggiunta, v6363 ha migliorato la sopravvivenza globale in modo dipendente dalla dose, con un tempo di sopravvivenza mediano superiore a 63 giorni per dosi di 3 mg/kg e 10 mg/kg rispetto a 43 giorni per il controllo con IgG (Figura 32B e Tabella 28). La dose di 3 mg/kg è stata associata a un tasso di risposta aumentato (5/10) rispetto al controllo (0/8). Tutti i topi trattati con v6363 con la dose di 10 mg/kg non soltanto hanno risposto alla terapia (9/9), ma hanno anche mostrato prevenzione della progressione tumorale. Inoltre, la maggior parte dei tumori ha avuto risposte parziali obiettive (7/9) e, al termine dello studio, molti non presentavano malattia residua zero (6/9). v6363 è stato ben tollerato a tutte le dosi, non sono stati osservati eventi avversi e non è stata osservata perdita di peso corporeo.

Tabella 28:

Risposta tumorale		IgG	6363 0.3 mg/kg	6363 1 mg/kg	6363 3 mg/kg	6363 10 mg/kg
Giorno 43	TV medio (mm ³) (% di cambiamento dal basale)	1963 (+1119%)	1916 (+1073%)	1613 (+895%)	1268 (+682%)	84 (-49%)
	rapporto T/C (IgG)	1	0.97	0.82	0.64	0.04
	Responder (TV < 50% del controllo)	0/8	0/10	2/10	5/10	9/9
	PR (regressione dal basale > 10%)	0/8	0/10	0/10	0/10	7/9
	ZRD (TV < 20 mm ³)	0/8	0/10	0/10	0/10	6/9
Tempo alla progressione	Tempo di raddoppiamento del tumore (giorni)	9	9	14	17	52
Risposta di sopravvivenza	Sopravvivenza mediana (giorni)	43	41	50	>63	>63
Peso corporeo	Variazione % dal basale	+10%	+10%	+9%	+5%	+0%

Questi dati mostrano che l'ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v6363) è efficace in un modello di xenotrapianto di tumore mammario metastatico HER2 3+ resistente a Trastuzumab+Pertuzumab. Il trattamento con v6363 è associato a un alto tasso di risposta, compromette significativamente la progressione del tumore e prolunga la sopravvivenza nei cancri mammari HER2 3+ resistenti allo standard di cura.

Esempio 31: ADC anti-HER2 biparatopico rispetto a combinazioni di standard di cura in PDX HBCx-13b resistente a Trastuzumab

L'efficacia di v6363 in un modello di xenotrapianto di cancro mammario derivato da paziente HER2 3+, ER-PR negativo, resistente a Trastuzumab (HBCx-13b), è stata valutata e confrontata con la combinazione di: Herceptin™ + Perjeta™; e Herceptin™ + Docetaxel.

Topi nudi atimici femmina sono stati inoculati con il tumore tramite l'inserzione sottocutanea di un frammento tumorale di 20 mm³. I tumori sono stati monitorati finché non hanno raggiunto un volume medio di 100 mm³; successivamente, gli animali sono stati randomizzati in 4 gruppi di trattamento (8-10 animali/gruppo): controllo con IgG umana non specifica, Herceptin™ + Docetaxel, Herceptin™ + Perjeta™, e v6363. Il dosaggio per ciascun gruppo era il seguente. Il controllo con IgG è stato dosato per via endovenosa con 10 mg/kg due volte a settimana fino al giorno di studio 29. Combinazione di Herceptin™ + Docetaxel: Herceptin™ è stato dosato per via endovenosa con 10 mg/kg IV due volte a settimana fino al giorno di studio 29 e Docetaxel è stato dosato per via intraperitoneale con 20 mg/kg il giorno di studio 1 e 22. Combinazione Herceptin™ + Perjeta™: Herceptin è stato dosato per via endovenosa con 5 mg/kg due volte a settimana fino al giorno di studio 29 e Perjeta™ è stato dosato per via endovenosa con 5 mg/kg due volte a settimana fino al giorno di studio 29. Il dosaggio di Herceptin™ e Perjeta™ è stato simultaneo. v6363 è stato dosato per via endovenosa con 10 mg/kg il giorno di studio 1, 15 e 29.

I risultati sono mostrati nella Figura 33 e nella Tabella 29. La Figura 33A mostra il volume del tumore nel tempo e la Figura 33B mostra un grafico di sopravvivenza. Questi risultati mostrano che la combinazione di Herceptin™ + Perjeta™ non ha prodotto alcuna inibizione della crescita tumorale rispetto al controllo con IgG e ha superato i 1800 mm³ il giorno 39. La combinazione di Herceptin™ + Docetaxel non ha ridotto significativamente la crescita tumorale, tuttavia ha prolungato la sopravvivenza mediana a 53 giorni rispetto a 43 giorni per il controllo con IgG. v6363 ha prodotto una significativa inibizione della crescita tumorale (T/C - 0,04), in cui tutti i tumori hanno risposto alla terapia e 7/10 tumori hanno riscontrato regressioni complete (malattia residua zero). v6363 ha prolungato significativamente la sopravvivenza rispetto a entrambe le terapie combinate. I pesi corporei tra le coorti non sono stati significativamente influenzati dai trattamenti.

Tabella 29:

Risposta tumorale		IgG	HerceptinTM PerjetaTM	HerceptinTM Docetaxel	v6363 10 mg/kg
Giorno 39	TV medio (mm ³) (% di cambiamento dal basale)	1809 (+1023%)	1975 (+1085%)	1328 (+714%)	76 (-54%)
	rapporto T/C (IgG)	1.0	1.10	0.73	0.04
	Responder (TV < 50% del controllo)	0/8	0/8	1/10	9/9
	PR (regressione dal basale >10%)	0/8	0/8	0/10	8/9
	ZRD (TV < 20 mm ³)	0/8	0/8	0/10	6/9
Risposta di sopravvivenza	Sopravvivenza mediana (giorni)	43	39	53	>63
Peso corporeo	Variazione % dal basale	+10%	+7%	+3%	-2%

Questi risultati mostrano che l'ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v6363) è superiore alle combinazioni di standard di cura rispetto a tutti i parametri testati in questo modello di xenotrapianto.

Esempio 32: Efficacia di un ADC anti-HER2 biparatopico in un modello di xenotrapianto tumorale derivato da cellule di cancro mammario

HER2+ resistenti a Trastuzumab

È stata valutata l'efficacia di v6363 in un modello di xenotrapianto derivato da cellule di cancro mammario HER2 3+ resistenti a Trastuzumab (JIMT-1, HER2 2+) (Tanner et al. 2004. Molecular Cancer Therapeutics 3: 1585-1592).

Topi RAG2 femmine sono stati inoculati con il tumore per via sottocutanea. I tumori sono stati monitorati finché non hanno raggiunto un volume medio di 115 mm³; successivamente, gli animali sono stati randomizzati in 2 gruppi di trattamento: Trastuzumab (n=10) e v6363. Il dosaggio per ciascun gruppo era il seguente. Trastuzumab è stato somministrato per via endovenosa con 15 mg/kg il giorno di studio 1 e 10 mg/kg due volte a settimana fino al giorno di studio 26. v6363 è stato somministrato per via endovenosa con 5 mg/kg i giorni di studio 1 e 15 e con 10 mg/kg i giorni 23 e 30 e 9 mg/kg i giorni 37 e 44.

I risultati sono mostrati nella Figura 34 e nella Tabella 30. Questi risultati mostrano che v6363 ha significativamente inibito la crescita del tumore (T/C - 0,74) rispetto a Trastuzumab il giorno di studio 36. Il trattamento con v6363 e Trastuzumab non ha cambiato significativamente il peso corporeo. L'esposizione sierica di v6363 era di 17,9 µg/ml 7 giorni dopo la prima dose di 10 mg/kg.

Tabella 30:

Risposta tumorale		Trastuzumab	6363
Giorno 36	TV medio (mm ³) (% di cambiamento dal basale)	718 (+541)	532 (+335%)
	rapporto T/C (Tras)	1	0,74
	Responder (TV < 50% del controllo)	1/10	2/13
	PR (regressione dal basale >10%)	0/10	0/13
	ZRD (TV < 20 mm ³)	0/10	0/13
Peso corporeo	Variazione % dal basale	+5.8%	+3.1%
Esposizione al farmaco (giorno 7)	Concentrazione sierica media (ug/ml)	187.2	17.9

Questi risultati mostrano che l'ADC biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v6363) è efficace in un cancro mammario resistente a Trastuzumab e ha una potenziale utilità nel trattamento dei cancri mammari che sono resistenti agli standard di cura attuali.

Esempio 33: Legame di FcγR a Fc eterodimerico di anticorpi biparatopici anti-HER2 e ADC biparatopici anti-HER2

Il legame dell'anticorpo biparatopico anti-HER2 (v5019, v7019, v10000) e ADC (v6363, v7148 e v10553) avente un Fc eterodimerico,

con FcγR umani è stato valutato e confrontato con FSA anti-HER2 (v506) e ADC (v6246) avente un Fc omodimerico.

L'affinità di FcγR alla regione Fc dell'anticorpo è stata misurata mediante SPR usando ProteOn XPR36 (BIO-RAD). HER2 è stato immobilizzato (3000 RU) su chip CM5 mediante accoppiamento amminico standard. Gli anticorpi sono stati catturati dall'antigene sulla superficie di HER2. FcγR purificato è stato iniettato a varie concentrazioni (20-30 μl/min) per 2 minuti, seguito da una dissociazione di 4 minuti. I sensogrammi sono stati adattati globalmente a un modello di legame di Langmuir 1: 1. Gli esperimenti sono stati eseguiti a 25 °C.

I risultati sono mostrati nella Tabella 31. Gli anticorpi biparatopici anti-HER2 eterodimerici e ADC esemplificativi si legano a CD16aF, CD16aV158, CD32aH, CD32aR131, CD32bY163 e CD64A con affinità paragonabili. La coniugazione degli anticorpi con SMCC-DM1 non influenza negativamente il legame a FcγR. Gli anticorpi biparatopici anti-HER2 eterodimerici hanno un'affinità approssimativamente da 1,3 a 2 volte superiore per CD16aF, CD32aR131, CD32aH rispetto a FSA anti-HER2 omodimerico (v506) e ADC (v6246). Questi risultati mostrano che gli anticorpi biparatopici anti-HER2 eterodimerici e ADC si legano a differenti forme polimorfiche di FcγR sulle cellule effettrici immunitarie con affinità simile o maggiore rispetto a una IgG1 omodimerica WT.

Tabella 31: Legame di FcγR umano mediante SPR

Variante	10uM CD16a v158		10uM CD16aF		10uM CD32aR131		10uM CD32aH		10uM CD32b Y163		100nM CD64A	
	KD med	SD	KD med	SD	KD med	SD	KD med	SD	KD med	SD	KD med	SD
v506	1.5E-07	2E-08	7.1E-07	1.E-08	7.6E-07	1.E-07	6.3E-07	2E-08	2.4E-06	1.E-07	8.64E-10	4.33E-10
v6246	1.6E-07	2E-08	7.0E-07	9.E-09	7.4E-07	7.E-08	6.3E-07	2E-08	2.1E-06	7.E-08	1.08E-09	5.13E-10
v10000	1.2E-07	1E-08	4.8E-07	2.E-08	5.1E-07	9.E-08	4.6E-07	2E-08	1.5E-06	7.E-08	8.41E-10	4.74E-10
v10553	1.2E-07	2E-08	4.9E-07	2.E-07	3.5E-07	1.E-07	3.6E-07	4E-09	1.2E-06	7E-08	4.95E-10	1.41E-10
v7091	1.2E-07	1E-08	5.1E-07	2.E-08	5.6E-07	9.E-08	5.0E-07	3E-08	1.7E-06	8E-08	9.68E-10	5.05E-10
v7148	1.2E-07	2E-08	5.4E-07	2.E-07	3.7E-07	1.E-07	4.2E-07	1E-08	1.5E-06	1.E-07	5.77E-10	2.02E-10
v5019	1.3E-07	1E-08	5.2E-07	1.E-08	5.6E-07	6.E-08	4.7E-07	2E-08	1.6E-06	2.E-07	8.44E-10	4.88E-10
v6363	1.2E-07	2E-08	4.5E-07	1.E-07	3.5E-07	1.E-07	3.4E-07	1E-08	1.2E-06	5.E-08	4.58E-10	1.13E-10

Esempio 34: Efficacia di anticorpi biparatopici esemplificativi anti-HER2 in vivo in un modello di xenotrapianto tumorale derivato da cellule di cancro ovarico sensibili a trastuzumab

Il modello di xenotrapianto derivato da cellule di cancro ovarico umano stabilito SKOV3, descritto nell'Esempio 17, è stato usato per

valutare l'efficacia antitumorale degli anticorpi biparatopici esemplificativi anti-HER2, v5019, v7091 e v10000.

Topi nudi atimici femmina sono stati inoculati con una sospensione tumorale di 325.000 cellule in HBSS, per via sottocutanea, sul fianco sinistro. I tumori sono stati monitorati finché non hanno raggiunto un volume medio di 190 mm³ e arruolati in modo randomizzato e sfalsato in 4 gruppi di trattamento: controllo con IgG umana non specifico, v5019, v7091 e v10000. Il dosaggio per ciascun gruppo era il seguente. IgG umana non specifica è stata dosata per via endovenosa con 10 mg/kg a partire dal giorno 1 dello studio, due volte a settimana, fino al giorno 26 dello studio. V5019, v7091 e v10000 sono stati dosati per via endovenosa con 3 mg/kg a partire dal giorno 1 dello studio, due volte a settimana, fino al giorno 26 dello studio. Il volume del tumore è stato misurato durante tutto lo studio e i parametri elencati nella Tabella 32 sono stati misurati il giorno 29.

I dati sono presentati nella Figura 35A (crescita del tumore), Figura 35B (grafico di sopravvivenza) e Tabella 32 e mostrano che il trattamento con v5019, v7091 e v10000 ha avuto come risultato inibizione della crescita del tumore (T/C: 0,53-0,71), numero di tumori rispondenti, tempo alla progressione e sopravvivenza il giorno 29 dello studio paragonabili rispetto al controllo con IgG. L'esposizione sierica di v5019, v7091 e v10000 era simile (31-41 microg/ml) il giorno 7 dello studio.

Tabella 32:

Risposta tumorale		IgG (n=8)	v5019 (n=11)	V7091 (n=11)	V10000 (n=11)
Giorno 29	TV medio (mm ³) (% di cambiamento dal basale)	1903 (+899%)	1001 (+416%)	1354 (+618%)	1114 (+503%)
	rapporto T/C (Tras)	1	0.53	0.71	0.58
	Responder (TV < 50% del controllo)	1/8	5/11	4/11	6/11
	PR (regressione dal basale >10%)	0/8	1/11	0/11	0/11
	ZRD (TV < 20 mm ³)	0/8	0/11	0/11	0/11
Tempo alla progressione	Tempo di raddoppiamento del tumore (giorni)	12	15	16	15
Sopravvivenza	Sopravvivenza mediana (giorni)	29	Nd	37	41
Esposizione al farmaco (giorno 7)	Concentrazione sierica media (ug/ml)	nd	31.2	41.0	31.2

Questi risultati mostrano che gli anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi, v5019, v7091 e v10000, hanno una potenziale utilità nel trattamento di cancro ovarico con sovraespressione di HER2, moderatamente sensibili a Trastuzumab.

Esempio 35: Anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi inibiscono la crescita del tumore in modo dose-dipendente nello xenotrapianto tumorale derivato da cellule di cancro ovarico sensibili a Trastuzumab

Il modello di xenotrapianto derivato da cellule di cancro ovarico umano stabilito SKOV3, descritto nell'Esempio 17, è stato usato per valutare l'efficacia dose-dipendente di un anticorpo anti-HER2 biparatopico esemplificativo, v10000.

Topi nudi atimici femmina sono stati inoculati con una sospensione tumorale di 325.000 cellule in HBSS, per via sottocutanea, sul fianco sinistro. I tumori sono stati monitorati finché non hanno raggiunto un volume medio di 190 mm³ e sono stati assegnati in modo randomizzato e sfalsato in 6 gruppi di trattamento: controllo con IgG umana non specifica e 5 dosi crescenti di v10000. 9-13 animali sono stati inclusi in ciascun gruppo. Il dosaggio per ciascun gruppo era il seguente. Il controllo con IgG è stato somministrato per via endovenosa con 10 mg/kg due volte a settimana fino al giorno di studio 26. V10000 è stato somministrato per via endovenosa con 0,1, 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg due volte a settimana.

I dati sono presentati nella Figura 36 e nella Tabella 33 e mostrano che il trattamento con v10000 induce l'inibizione della crescita tumorale in modo dose-dipendente (T/C: 0,28-0,73) rispetto al controllo con IgG. In aggiunta, v10000 è stato associato in modo dose-dipendente a tumori rispondenti (7/9 a 10 mg/kg e 3/11 a 0,1 mg/kg) e ha aumentato il tempo alla progressione (24 giorni a 10 mg/kg e 12 giorni a 0,1 mg/kg) il giorno di studio 29. L'esposizione sierica di v10000 il giorno 7 era dose-dipendente e aumentava da 0,46 microg/ml con una dose di 0,1 mg/kg a 79,3 microg/ml con una dose di 10 mg/kg.

Tabella 33:

Risposta del Tumore		IgG (n=8)	V10000, 10 mg/kg (n=9)	V10000, 3 mg/kg (n=11)	V10000, 1 mg/kg (n=11)	V10000, 0,3 mg/kg (n=13)	V10000, 0,1 mg/kg (n=11)
Giorno 29	TV medio (mm ³) (% di cambiamento dal basale)	1903 (+899%)	543 (+281%)	1114 (+503%)	1534 (+688%)	1535 (+694%)	1385 (+643%)
	rapporto T/C	1	0.28	0.58	0.81	0.81	0.73
	Responder (TV < 50% del controllo)	1/8	7/9	6/11	2/11	3/13	3/11
	PR (regressione dal basale >10%)	0/8	1/9	0/11	0/11	0/13	0/11
	ZRD (TV < 20 mm ³)	0/8	0/9	0/11	0/11	0/13	0/11
Tempo alla Progressione	Tempo di raddoppiamento del tumore (giorni)	12	24	15	14	12	12
Esposizione al farmaco (Giorno7)	Concentrazione sierica media (ug/ml)	nd	79.3	31.2	4.7	1.5	0.46

Questi risultati mostrano che l'anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo, v10000, inibisce la progressione del tumore in modo dipendente dalla dose.

Esempio 36: Capacità di anticorpo biparatopico anti-HER2 e di ADC Biparatopico anti-HER2 di inibire la crescita di linee cellulari che esprimono HER2, e EGFR e/o HER3 ai livelli 3+, 2+ o 1+

L'esperimento seguente è stato eseguito per misurare la capacità di un anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativo (v10000) e del

corrispondente ADC anti-HER2 biparatopico (v10553) di inibire la crescita di una selezione di linee cellulari di tumore mammario, coloretale, gastrico, polmonare, della pelle, ovarico, renale, pancreatico, della testa e del collo, uterino e vescicale che esprimono HER2, e EGFR e/o HER3 ai livelli 3+, 2+, 1+ o 0+ come definito da IHC.

L'esperimento è stato eseguito come segue. La densità di semina ottimale per ciascuna linea cellulare è stata determinata unicamente per identificare una densità di semina che ha prodotto approssimativamente il 60-90% di confluenza dopo la durata di 72 ore del saggio. Ogni linea cellulare è stata seminata alla densità di semina ottimale, nel terreno di crescita appropriato per ciascuna linea cellulare, in una piastra a 96 pozzetti e incubata per 24 ore a 36 °C e CO₂ al 5%. Gli anticorpi sono stati aggiunti a tre concentrazioni (v10000 a 300, 30 e 0,3 nM; v10553 a 300, 1, 0,1 nM), insieme a controllo positivo e controllo con veicolo. La combinazione di farmaci chemococktail di controllo positivo di 5-FU (5-fluorouracile), paclitaxel, cisplatino, etoposide (25 microM), il controllo con veicolo era costituito da PBS. I trattamenti con anticorpi e i controlli sono stati incubati con le cellule per 72 ore in un incubatore per coltura cellulare a 36 °C e CO₂ al 5%. Le piastre sono state centrifugate a 1200 giri al minuto per 10 minuti e il terreno di coltura è stato completamente rimosso mediante aspirazione. Il terreno RPMI SFM (200 microL) e MTS (20 microL) sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e incubati a 36 °C e CO₂ al 5% per 3 ore. La densità ottica è stata letta a 490 nM e la percentuale di inibizione della crescita è stata determinata rispetto al controllo con veicolo.

I risultati sono mostrati nella Figura 37 e un riepilogo di tutti i risultati del test è mostrato nella Figura 38. La Figura 37A mostra i risultati dell'inibizione della crescita di v10000. Questi risultati mostrano che v10000 può inibire la crescita di linee cellulari di tumore mammario, coloretale, gastrico, polmonare, cutaneo, ovarico, renale, pancreatico, della testa e del collo, uterino ed endometriale che esprimono HER2 e coesprimono EGFR e/o HER3 ai livelli 3+, 2+, 1+ o 0+. L'attività di v10000 e v10553 a 300 nM è riepilogata nella Figura 38, dove '+' indica linee cellulari che hanno mostrato una riduzione della vitalità cellulare a 300 nM, che era > 5% del controllo con veicolo, e '-' indica una vitalità ≤ 5% del controllo con veicolo.

La Figura 37B mostra i risultati dell'inibizione della crescita di v10553. Questi risultati mostrano che v10553 può inibire la crescita di linee cellulari di tumore mammario, coloretale, gastrico, polmonare, cutaneo, ovarico, renale, pancreatico, della testa e del collo, uterino e della vescica che esprimono HER2 e coesprimono EGFR e/o HER3 ai livelli 3+, 2+, 1+ o 0+ (si veda anche la Figura 38). I risultati tracciati nella Figura 37B sono definiti da linee cellulari che hanno mostrato un valore minimo di inibizione della crescita dose-dipendente a 300 e 1 nM e in cui l'inibizione della crescita a 1 nM è uguale o superiore al 5% (Figura 37B).

Questi risultati mostrano che l'anticorpo biparatopico esemplificativo v10000 e l'ADC v10553 possono inibire la crescita di cellule tumorali originanti da istologie della mammella, del colon-retto, gastriche, del polmone, della pelle, ovariche, renali, pancreatiche, della testa e del

collo, uterine e della vescica che esprimono HER2 ai livelli 3+, 2/3+, 2+, 1+ e 0/1+ e che coesprimono EGFR e/o HER3 ai livelli 2+, 1+.

Esempio 37: Capacità degli anticorpi biparatopici anti-HER2 di mediare l'ADCC di cellule cancerose HER2 2+, 1+ e 0/1+

Il seguente esperimento è stato eseguito per determinare la capacità degli anticorpi biparatopici anti-HER2 di mediare l'ADCC di cellule tumorali che esprimono HER2 ai livelli 2+, 1+ e/o 0/1+ e che coesprimono EGFR e/o HER3 ai livelli 2+ o 1+. Gli anticorpi biparatopici anti-HER2 testati erano 5019, 10000 e 10154 (una versione afucosilata di v10000), con Herceptin™ e v506 come controlli.

L'esperimento di ADCC è stato eseguito come descritto nell'Esempio 11 e nell'Esempio 25 con E/T: 5:1 con cellule effettrici NK-92 (Figura 39), e come descritto nell'Esempio 26 con E/T 30:1 con cellule effettrici PBMC.

I risultati sono mostrati nella Figura 39 (cellule effettrici NK-92) e nella Figura 40 (cellule effettrici PBMC). La Figura 39A mostra i risultati di ADCC della linea cellulare tumorale della testa e del collo HER2 2+ (carcinoma ipofaringeo), FaDu, in cui l'anti-HER2 biparatopico suscita approssimativamente il 15% di lisi cellulare massima. La Figura 39C mostra i risultati di ADCC della linea cellulare tumorale pancreaticata HER2 1+ BxPC3 e la Figura 39D i risultati della linea cellulare tumorale pancreaticata HER2 2+ MiaPaca2. La Figura 39B mostra i risultati di ADCC della linea cellulare tumorale HER2 0/1+ A549 NSCLC (cancro del polmone non a piccole cellule). Nelle linee cellulari tumorali BxPC3, MiaPaca2 e A549, v10000 ha mediato approssimativamente il 5% di lisi massima di cellule tumorali.

La Figura 40 mostra i risultati di ADCC nelle cellule A549, NCI-N87 e HCT-116, in cui PBMC sono state usate come cellule effettrici. La Figura 40A mostra i risultati di ADCC della linea cellulare tumorale HER2 0/1+ A549 NSCLC, in cui v10000 ha indotto ~ 28% di lisi cellulare massima e questo era paragonabile a Herceptin™ che ha un livello equivalente di contenuto di fucosio nel glicano N-legato. v10154 biparatopico afucosilato al 100% (0% di fucosio) esemplificativo mostra un aumento nella lisi cellulare massima (40% di lisi cellulare massima) e una potenza aumentata rispetto a v10000 e Herceptin che hanno approssimativamente l'88% di fucosio nel glicano N-legato.

La Figura 40B mostra i risultati di ADCC della linea cellulare tumorale gastrica HER2 3+, NCI-N87. La Figura 40B mostra che v5019 biparatopico esemplificativo (approssimativamente fucosilato all'88%) media approssimativamente il 23% di lisi cellulare massima e ha una EC50 inferiore rispetto a Trastuzumab v506 (approssimativamente fucosilato al 98%).

La Figura 40C mostra i risultati di ADCC della linea cellulare tumorale coloretale HER2 1+, HCT-116. La Figura 40C mostra che v5019 biparatopico esemplificativo (approssimativamente fucosilato all'88%) media approssimativamente il 25% di lisi cellulare massima ed è più potente rispetto a Trastuzumab v506 (approssimativamente fucosilato al 98%).

Questi risultati mostrano che gli anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi possono suscitare l'ADCC delle cellule tumorali HER2

01/+, 2+ e 3+ che hanno origine da istologie tumorali della testa e del collo, gastriche, NSCLC e pancreatiche. L'ADCC in presenza di cellule NK-92 come cellule effettrici aveva un requisito di livello del recettore HER2 2+ apparente (vale a dire 2+ o maggiore) per mostrare una percentuale più alta (> 5%) di lisi cellulare massima. Tuttavia, quando le cellule PBMC sono state usate come cellule effettrici, livelli più alti di lisi cellulare massima sono stati raggiunti (>5% e fino al 28% o 40%; rispettivamente v10000 e v10154) ed erano indipendenti dalla densità del recettore HER2, poiché è stata osservata un'ADCC >5% ai livelli di densità del recettore HER2 0/1+, 1+ e 3+.

Esempio 38: Affinità di legame e cinetica di HER2 come misurate mediante SPR

Come indicato nell'Esempio 1, anticorpi biparatopici anti-HER2 aventi differenti formati di frazione legante l'antigene sono stati realizzati come descritto nella Tabella 1. I formati includono il formato scFv-scFv (v6717), il formato Fab-Fab (v6902 e v6903), insieme al formato Fab-scFv (v5019, v7091 e v10000). Il seguente esperimento è stato eseguito per confrontare l'affinità di legame e la cinetica di HER2 di questi formati di anticorpo biparatopico anti-HER2 esemplificativi.

L'affinità e la cinetica di legame a ECD HER2 murino (Sino Biological 50714-M08H) sono state misurate mediante cinetica a ciclo singolo con il sistema SPR T200 di Biacore (GE Healthcare). Un numero compreso tra 2000-4000 RU di Fc antiumano è stato immobilizzato su un chip CM5 usando accoppiamento amminico standard. 5019 è stato catturato sulla superficie di Fc antiumano a 50 RU. L'ECD di HER2 ricombinante (1,8-120 nM) è stato iniettato a 50 µl/min per 3 minuti, seguito da una dissociazione di 30 minuti dopo l'ultima iniezione. Le diluizioni di HER2 sono state analizzate in duplicato. I sensogrammi sono stati adattati globalmente a un modello di legame di Langmuir 1:1. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti a temperatura ambiente, 25 °C.

I risultati nella Tabella 34 mostrano che gli anticorpi biparatopici Fab-scFv (v5019 e v7091), le varianti Fab-Fab (v6902 e v6903) e la variante scFv-scFv (v6717) hanno un'affinità di legame paragonabile (1-4 nM). La variante Fab-scFv v10000 aveva un'affinità di legame superiore (KD inferiore) di approssimativamente 0,6 nM. L'anticorpo ECD4 anti-HER2 monospecifico (v506) e l'anticorpo ECD2 anti-HER2 (v4184) sono stati inclusi nel saggio come controlli. Questi risultati indicano che i formati molecolari inclusi v6717, v6902, v6903, v5019 e/o v7091 hanno affinità di legame equivalenti e, pertanto, le differenze di funzione tra questi anticorpi possono essere considerate come risultanti da differenze nel formato.

Tabella 34:

Variante di anticorpo	MEDIA			DEV STD		
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
v506	7.34E+04	4.08E-05	5.56E-10	1.13.E+03	3.04E-06	3.28E-11
v4184	3.61E+04	5.46E-04	1.56E-08	7.78.E+03	2.80E-05	4.12E-09
v5019	6.01E+04	7.77E-05	1.29E-09	1.30.E+03	8.56E-07	4.24E-11

v7091	5.17E+04	1.19E-04	2.31E-09	2.70.E+03	1.49E-05	4.09E-10
v10000	6.44E+04	3.69E-05	5.79E-10	6.18.E+03	6.72.E-06	1.42.E-10
v6902	6.83E+04	1.72E-04	2.72E-09	1.93E+04	4.49E-05	1.43E-09
v6903	7.10E+04	1.71E-04	2.75E-09	3.60E+04	3.96E-06	1.34E-09
v6717	1.50E+05	5.33E-04	4.45E-09	1.28E+05	2.54E-04	2.11E-09

Esempio 39: Effetto del formato di anticorpo biparatopico anti-HER2 sul legame alle cellule tumorali HER2+

Il seguente esperimento è stato eseguito per confrontare le proprietà di legame all'intera cellula (B_{max} e K_D apparente) di anticorpi biparatopici anti-HER2 ECD2 x ECD4 esemplificativi che hanno differenti formati molecolari (per esempio v6717, scFv-scFv IgG1; v6903 e v6902 Fab-Fab IgG1; v5019, v7091 e v10000 Fab-scFv IgG1).

L'esperimento è stato eseguito come descritto nell'Esempio 6. I risultati sono mostrati nella Figura 41 e nelle Tabelle 35-38. La Figura 41A e la Tabella 35 mostrano i risultati di legame FACS degli anticorpi biparatopici esemplificativi alla linea cellulare di tumore mammario BT474 HER2 3+. I risultati mostrano che tutti gli anticorpi anti-HER2 hanno un B_{max} superiore (da 1,5 a 1,7 volte maggiore), quando confrontati con l'anticorpo anti-HER2 bivalente monospecifico v506. I formati Fab-scFv (v5019, v7091 e v10000) e Fab-Fab (v6903) avevano approssimativamente un B_{max} aumentato di 1,7 volte e il formato scFv-scFv (v6717) aveva un B_{max} aumentato di 1,5 volte rispetto a v506. Una combinazione equimolare di FSA v506 e v4184 ha avuto come risultato un aumento di 1,7 volte del B_{max} . La K_D apparente degli anticorpi biparatopici anti-HER2 esemplificativi era approssimativamente da 2 a 3 volte più alta rispetto a v506 monospecifico.

Tabella 35: Legame FACS BT-474

Variante di anticorpo	K_D (nM)	B_{max}
v506	9.0	23536
v10000	16	39665
v506+ v4184	16	40320
v5019	21	39727
v7091	22	36718
v6717	30	36392
v6903	31	40321

La Figura 41B e la Tabella 36 mostrano i risultati di legame FACS alla linea cellulare di tumore mammario JIMT-1 HER2 2+. I risultati mostrano che tutti gli anticorpi anti-HER2 hanno un B_{max} superiore (da 1,5 a 1,8 volte maggiore), quando confrontati con l'anticorpo anti-HER2 bivalente monospecifico v506. I formati Fab-scFv (v7091 e v10000) e Fab-Fab (v6903) avevano un B_{max} aumentato approssimativamente di 1,7 volte, il formato scFv-scFv (v6717) aveva un B_{max} aumentato di 1,5 volte e la combinazione Fab-scFv (v5019) e FSA (v506 + v4184) aveva un B_{max} aumentato di 1,8 volte rispetto a v506. La K_D apparente degli anticorpi Fab-scFv biparatopici anti-HER2 esemplificativi era

approssimativamente da 2 a 4 volte superiore rispetto a v506 monospecifico; mentre la K_D di Fab-Fab (v6903) e quella di scFv-scFv (v6717) erano approssimativamente 8 volte superiori rispetto a v506.

Tabella 36: Legame FACS JIMT-1

Variante di anticorpo	K_D (nM)	Bmax
v506	3.5	2574
v10000	7.6	4435
v506+ v4184	8.0	4617
v5019	12	4690
v7091	14	4456
v6717	26	3769
v6903	28	4452

La Figura 41C e la Tabella 37 mostrano i risultati del legame FACS degli anticorpi biparatopici esemplificativi alla linea cellulare di tumore mammario HER2 1+ MCF7. I risultati mostrano che la combinazione di anticorpo anti-HER2 v10000 e FSA (v506 + v4184) hanno un Bmax 1,6 volte superiore rispetto all'anticorpo anti-HER2 bivalente monospecifico v506. Il formato Fab-scFv (v5019, v7091) aveva approssimativamente un Bmax aumentato di 1,4 volte; il formato scFv-scFv (v6717) di 1,3 volte e il formato Fab-Fab (v6903) aveva un Bmax aumentato di 1,2 volte rispetto a v506. La K_D apparente della combinazione di Fab-scFv biparatopico anti-HER2 esemplificativo, Fab-Fab (v6903) e FSA (v506 + v4184) era approssimativamente da 2 a 3 volte inferiore rispetto a v506; mentre la K_D di scFv-scFv (v6717) era approssimativamente 3 volte superiore rispetto a v506.

Tabella 37: Legame FACS MCF7

Variante di anticorpo	K_D (nM)	Bmax
v506+ v4184	4.5	1410
v7091	6.1	1216
v5019	6.3	1201
v10000	6.8	1381
v6903	7.1	1105
v506	12	889
v6717	32	1167

La Figura 41D e la Tabella 38 mostrano i risultati del legame FACS degli anticorpi biparatopici esemplificativi alla linea cellulare tumorale mammaria HER2 0/1+ MDA-MD-231. I risultati mostrano che gli anticorpi anti-HER2 biparatopici esemplificativi avevano un Bmax aumentato approssimativamente da 1,3 a 1,4 volte rispetto all'anticorpo anti-HER2 bivalente monospecifico v506. La combinazione di FSA (v506 +

v4184) aveva un Bmax aumentato di 1,7 volte. La K_D apparente della combinazione di anticorpi Fab-scFv biparatopici anti-HER2 esemplificativi (v5019, v7091, v10000) e FSA (v506 + v4184) aveva una K_D approssimativamente equivalente rispetto a v506; mentre Fab-Fab (v6903) e scFv-scFv (v6717) avevano una K_D approssimativamente di 4 e 16 volte superiore, rispettivamente, rispetto a v506.

Tabella 38: Legame FACS MDA-MB-231

Variante di anticorpo	K_D (nM)	Bmax
v506	4.8	395
v10000	5.6	558
v506+ v4184	7.3	662
v7091	7.9	525
v5019	8.7	548
v6903	17	534
v6717	77	524

I risultati del legame delle cellule tumorali mostrano che gli anticorpi biparatopici anti-HER2 con differenti formati molecolari hanno un Bmax aumentato su cellule tumorali HER2 3+, 2+, 1+ e 0/1+ rispetto a un anticorpo anti-HER2 monospecifico bivalente. Dei differenti anticorpi biparatopici anti-HER2, il formato scFv-scFv ha avuto il guadagno di Bmax minimo rispetto a v506 su cellule tumorali HER2 3+, 2+, 1+ e 0/1+. Questi risultati mostrano inoltre che i formati scFv-scFv e Fab-Fab hanno l'aumento massimo di K_D su cellule tumorali HER2 3+, 2+, 1+ e 0/1+ rispetto a v506 monospecifico (aumento da 3 a 16 volte) e ai formati Fab-scFv biparatopici (approssimativamente di 2 volte o maggiore). L'aumento di K_D è un'indicazione di una riduzione nel legame avido e suggerisce che differenti formati biparatopici hanno meccanismi esclusivi di legame a HER2 sulla superficie cellulare.

Esempio 40: Effetto del formato di anticorpo biparatopico anti-HER2 sull'internalizzazione nelle cellule HER2+

Il seguente esperimento è stato eseguito per confrontare la capacità di anticorpi biparatopici anti-HER2 ECD2 x ECD4 esemplificativi, che hanno differenti formati molecolari (per esempio v6717, scFv-scFv IgG1; v6903 e v6902 Fab-Fab IgG1; v5019, v7091 e v10000 Fab-scFv IgG1), di internalizzarsi nelle cellule HER2+ che esprimono HER2 a livelli variabili.

L'esperimento è stato eseguito come descritto in dettaglio nell'Esempio 9. I risultati sono mostrati nella Figura 42 e nelle Tabelle 39-41. La Figura 42A e la Tabella 39 mostrano i risultati di internalizzazione in HER2 3+ BT-474. Questi risultati mostrano che il formato Fab-scFv (v10000) e la combinazione di FSA (v506 + v4184) hanno quantità di anticorpo intracellulare 2,2 volte superiori rispetto a v506 anti-HER2 monospecifico. Il formato scFv-scFv (v6717) aveva quantità di accumulo di anticorpo intracellulare 1,9 volte maggiori; i formati Fab-scFv (v5019 e v7091) avevano quantità da 1,5 a 1,7 volte maggiori; e i formati Fab-Fab (v6902 e v6903) avevano quantità da 1,2 a 1,3 volte maggiori rispetto a v506.

Tabella 39: Internalizzazione BT-474

Variante di anticorpo	Superficie 4 °C	Superficie 37 °C	Interno 37 °C
v506	2156	1590	3453
v6902	2407	2077	4035
v6903	2717	986	4573
v7091	2759	2227	5111
v5019	2867	2675	5710
v6717	2006	1212	6498
v10000	3355	2851	7528
v506 + v4184	3998	2326	7569

La Figura 42B e la Tabella 40 mostrano i risultati di internalizzazione in HER2 2+ JIMT-1. Questi risultati mostrano che il formato Fab-scFv (v10000) e la combinazione di FSA (v506 + v4184) hanno rispettivamente quantità di anticorpo intracellulare 1,8 e 1,9 volte maggiori rispetto a v506 anti-HER2 monospecifico. Gli scFv-scFv (v6717) e i formati Fab-scFv (v5019) hanno quantità di accumulo di anticorpo intracellulare 1,4 volte maggiori; e i formati Fab-scFv (v7091) e Fab-Fab (v6902 e v6903) hanno quantità 1,2 volte maggiori rispetto a v506.

Tabella 40: Internalizzazione JIMT-1

Variante di anticorpo	Superficie 4 °C	Superficie 37 °C	Interno 37 °C
v506	337	-7.1	759
v6902	389	152	926
v7091	426	102	935
v6903	392	130	945
v5019	437	5.2	1035
v6717	247	31	1082
v10000	474	103	1375
v506 + v4184	583	89	1449

La Figura 42C e la Tabella 41 mostrano i risultati dell'internalizzazione in MCF7 HER2 1+. Questi risultati mostrano che il formato scFv-scFv e i formati Fab-scFv hanno quantità di anticorpo intracellulare 3,0 e 2,8 volte maggiori rispetto a v506 anti-HER2 monospecifico. Il formato Fab-scFv (v10000) e la combinazione di FSA (v506 + v4184) hanno quantità di accumulo di anticorpo intracellulare approssimativamente 2,0 volte maggiori; i formati Fab-scFv (v7091) e Fab-Fab (v6903) hanno quantità di accumulo di anticorpo intracellulare 1,8 volte maggiori rispetto a v506.

Tabella 41: Internalizzazione MCF7

Variante di anticorpo	Superficie 4 °C	Superficie 37 °C	Interno 37 °C
v506	48	10	48
v7091	77	27	87
v6903	81	35	89

v10000	78	20	96
v506 + v4184	87	19	103
v5019	81	17	134
v6717	48	31	145

Questi risultati mostrano che gli anticorpi biparatopici anti-HER2 con differenti formati molecolari hanno gradi univoci di internalizzazione nelle cellule tumorali HER2 3+, 2+ e 1+ che variano rispetto alla struttura e al formato dei domini leganti l'antigene. In generale, la combinazione di FSA monospecifico di v506 e v4184, i formati biparatopici Fab-scFv (v10000, v7091 e v5019) e scFv-scFv (v6717) hanno avuto i valori di internalizzazione più alti nelle cellule tumorali HER2 3+, 2+ e 1+. Mentre i formati biparatopici Fab-Fab (v6902 e v6903) hanno avuto i valori di internalizzazione più bassi nelle cellule tumorali HER2 3+, 2+ e 1+. Questi dati suggeriscono che il formato molecolare e la spaziatura geometrica dei domini leganti l'antigene hanno un'influenza sulla capacità degli anticorpi biparatopici di reticolare i recettori HER2 e successivamente di internalizzarsi nelle cellule tumorali HER2+. Il formato biparatopico Fab-Fab, avente la distanza massima tra i due domini leganti l'antigene, ha avuto come risultato il grado di internalizzazione più basso, mentre i formati Fab-scFv e scFv-scFv, aventi distanze più brevi tra i domini leganti l'antigene, hanno avuto una maggiore internalizzazione nelle cellule HER2+. Ciò è coerente con la correlazione tra potenza e lunghezza più corta di linker come descritto in Jost et al 2013, Structure 21, 1979-1991).

Esempio 41: Effetto del formato di anticorpo biparatopico anti-HER2 su ADCC nelle cellule HER2+

L'esperimento seguente è stato eseguito per confrontare la capacità degli anticorpi biparatopici anti-HER2 ECD2 x ECD4 esemplificativi, che hanno differenti formati molecolari (per esempio v6717, scFv-scFv IgG1; v6903 e v6902 Fab-Fab IgG1; v5019, v7091 e v10000 Fab-scFv IgG1), di mediare l'ADCC nelle cellule HER2+ che esprimono HER2 a livelli variabili.

Prima di eseguire il saggio di ADCC, è stata effettuata un'analisi dei glicopeptidi sui campioni di anticorpo per quantificare il contenuto di fucosio nel glicopeptide N-legato. Il metodo è stato seguito come descritto nell'Esempio 23. I risultati sono mostrati nella Tabella 42; i dati mostrano che le varianti biparatopiche esemplificative v5019, v6717, v6903 hanno un contenuto di fucosio equivalente nel glicano N-legato (91-93%). Campioni di anticorpo con livelli equivalenti di fucosio nell'N-glicano sono stati selezionati per il saggio ADCC per normalizzare il contenuto di fucosio nell'interpretazione dei risultati del saggio di ADCC.

Tabella 42: Analisi del peptide triptico LC-MS

Variante	Percentuale di glicopeptidi osservata CON Fucosio	Percentuale di glicopeptidi osservata SENZA Fucosio
v6903	90.7	9.3
v6717	92.8	7.2
v5019	91.3	8.7

L'esperimento di ADCC è stato eseguito come descritto nell'Esempio 11 con E/T: 5:1 con cellule effettrici NK-92. I risultati di ADCC sono mostrati nella Figura 43 e nelle Tabelle 43-45. La Figura 43A e la Tabella 43 mostrano i risultati di ADCC nelle cellule di tumore mammario HER2 2+ JIMT-1. Questi dati mostrano che v5019, v6717 e v6903 suscitano livelli simili di lisi cellulare massima e che il formato scFv-scFv (v6717) è meno potente rispetto a v5019 e v6903, quando le cellule tumorali HER2 2+ sono i target.

Tabella 43: ADCC JIMT-1

Variante di anticorpo	EC50 (nM)	% di lisi cellulare massima
v6903	~ 0.03	48
v5019	~ 0.16	47
v6717	~ 0.72	51

La Figura 43B e la Tabella 44 illustrano i risultati di ADCC nelle cellule tumorali mammarie MCF7 HER2 1+. Questi dati mostrano che v5019 e v6717 hanno una lisi cellulare massima leggermente superiore (27-30%) rispetto a v6903 (24%). Questi dati inoltre mostrano che v6717 è il meno potente, seguito da v6903 e v5019, che hanno valori EC50 inferiori.

Tabella 44: MCF7 ADCC

Variante di anticorpo	EC ₅₀ (nM)	% di lisi cellulare massima
v5019	~ 0.69	27
v6717	109	30
v6903	0.94	24

La Figura 43C e la Tabella 45 mostrano i risultati di ADCC nelle cellule di tumore mammario MDA-MB-231 HER2 0/1+. Questi dati mostrano che v5019 mostra una lisi cellulare massima leggermente superiore (77%) rispetto a v6903 (62%) e v6717 (63%). Questi dati mostrano inoltre che v6717 è il meno potente, seguito da v6903 e v5019, che hanno valori EC₅₀ inferiori.

Tabella 45: MDA-MB-231 ADCC

Variante di anticorpo	EC ₅₀ (nM)	% lisi cellulare massima (solo superiore)
v5019	0.20	71
v6717	10	63
v6903	0.79	62

Questi dati mostrano che gli anticorpi biparatopici anti-HER2 ECD2 x ECD4 esemplificativi suscitano livelli simili di lisi cellulare massima mediante ADCC in cellule tumorali HER2 2+ e 1+. Nonostante le somiglianze nella lisi cellulare massima, questi dati mostrano anche che i differenti formati molecolari hanno potenze ADCC uniche. Lo scFv-scFv era il meno potente (valori di EC₅₀ massimi) in HER2 2+ e HER2 1+. Differenti potenze tra i tre formati sono state osservate nei dati di ADCC che individuano le cellule HER2 1+, in cui i valori di EC₅₀ per v6717 > v6903 > v5019. Questi dati sono coerenti con le osservazioni presentate nell'Esempio 40 (legame FACS), dove è stato osservato un aumento di K_D (affinità ridotta) con i formati Fab-Fab e scFv-scFv.

Esempio 42: Effetto del formato di anticorpo biparatopico anti-HER2 sulla crescita delle cellule tumorali HER2 +

L'esperimento seguente è stato eseguito per confrontare l'effetto del formato di anticorpo biparatopico anti-HER2 sulla crescita delle cellule tumorali HER2 3+, 2+ e 1+, crescita basale o stimolata da ligando. La crescita basale è stata misurata come descritto nell'Esempio 15, mentre la crescita stimolata da ligando è stata misurata come descritto nell'Esempio 27. In entrambi i tipi di esperimenti, la crescita è stata misurata come % di sopravvivenza rispetto al trattamento di controllo.

La Figura 44 e la Tabella 46 mostrano l'effetto degli anticorpi biparatopici anti-HER2 ECD2 x ECD4 esemplificativi sulla crescita delle cellule di cancro mammario HER2 3+ (BT-474) in presenza di ligandi esogeni stimolatori della crescita (EGF e HRG). In assenza di EGF o HRG, gli anticorpi biparatopici anti-HER2 sono stati in grado di inibire la crescita delle cellule BT-474, in cui la % di sopravvivenza di ciascun gruppo di trattamento è stata classificata come segue: v6903 < v506 + v4184 < 506 < v7091 < v5019 < v10000 < v6717. In presenza di HRG, l'inibizione della crescita rispetto al controllo mock è stata raggiunta soltanto con la combinazione di FSA di v506 + v4184. In presenza di EGF è stata ottenuta l'inibizione della crescita rispetto al controllo mock, in cui la % di sopravvivenza di ciascun gruppo di trattamento è stata classificata come segue: v6903 < v506 + v4184 < 7091 < v10000 < 5019.

Tabella 46

Trattamento	% di sopravvivenza		
	Anticorpo da solo	+ HRG	+ EGF
Mock	100	143	131
v6717	113	126	129
v10000	70	118	78
v5019	67	133	81
v7091	61	119	61
v506	53	141	118
v506 + v4184	43	89	45
v6903	32	120	39

La Figura 45 mostra l'effetto dose-dipendente dei formati di anticorpo biparatopico anti-HER2 sull'inibizione della crescita della linea cellulare SKBr3 HER2 3+. I dati sono coerenti con i risultati presentati nella Figura 44, in cui la potenza/efficacia dell'ordine di rango dei formati biparatopici è il seguente Fab-Fab > Fab-scFv > scFv-scFv nelle cellule tumorali HER2 3+.

L'effetto dei formati di anticorpo biparatopico anti-HER2 sulla sopravvivenza delle cellule HER2+ è mostrato nella Figura 46, in cui la Figura 46A mostra il risultato nella linea cellulare SKOV3 HER2 2+/3+ sensibile a Trastuzumab a 300 nM; la Figura 46B mostra il risultato nelle cellule JIMT-1 HER2 2+ (resistenti a Trastuzumab) a 300 nM e la Figura 46C mostra il risultato nella linea cellulare MCF7 HER2 1+ a 300 nM. Nella linea cellulare SKOV3, è stata osservata una minima differenza tra i formati biparatopici nell'estensione dell'inibizione della crescita e non è stata osservata alcuna inibizione della crescita mediante uno qualsiasi degli anticorpi di test nelle cellule JIMT-1 e MCF7.

I dati nella Figura 44 e nella Figura 45 mostrano che gli anticorpi biparatopici anti-HER2 ECD2 x ECD4 con i formati Fab-scFv e Fab-Fab (v5019, v7091, v10000, v6903) sono in grado di inibire la crescita delle cellule tumorali HER2 3+ in assenza e in presenza di EGF o HRG. Nelle linee cellulari HER2 3+ BT-474 e SKBR3, l'inibizione della crescita rispetto al controllo mock è ordinata come segue, in cui v506 + v4184 > v6903 > v7091 > v10000 > v5019 > v506 > v6717. La distanza tra i domini leganti l'antigene (Fab-Fab > Fab-scFv > scFv-scFv) è correlata all'ordine di inibizione della crescita nelle cellule tumorali HER2 3+. In base ai dati nelle cellule tumorali sensibili a trastuzumab, BT-474 e SKBr3, può essere previsto che la differenza di inibizione della crescita tra i formati è significativa al livello HER2 3+, tuttavia, meno ai livelli HER2 2+ o HER2 1+.

Esempio 43: Valutazione dell'affinità di legame a HER2 e cinetica a livelli di cattura dell'anticorpo variabili

L'esperimento seguente è stato eseguito per confrontare la cinetica di legame a HER2 (kd, tasso di dissociazione) di anticorpi biparatopici anti-HER2 ECD2 x ECD4 esemplificativi quando catturati a densità superficiali variabili mediante SPR. La correlazione tra un tasso di dissociazione ridotto (più lento) con livelli crescenti di cattura dell'anticorpo (densità superficiale) è un'indicazione di legame Trans (vale a dire una molecola di anticorpo che si lega a due molecole di HER2, descritto nell'Esempio 12). In questo esperimento, il formato Fab-Fab (v6903) è stato confrontato con il formato Fab-scFv (v7091) per determinare la differenza potenziale nel legame Trans tra le varianti. A causa della maggiore distanza spaziale tra i domini leganti l'antigene, si ipotizza che il formato Fab-Fab possa essere in grado di creare legami Cis (interagendo con ECD 2 e 4 su una molecola di HER2); mentre, il Fab-scFv non sarebbe in grado di creare legami Cis a causa della distanza più breve tra i suoi domini leganti l'antigene. v506 monospecifico anti-HER2 è stato incluso come controllo.

L'esperimento è stato eseguito mediante SPR come descritto nell'Esempio 12. I dati sono mostrati nella Figura 47. La Figura 47A mostra il grafico e l'analisi di regressione lineare per kd (1/s) a differenti livelli di cattura dell'anticorpo con v6903 e v7091. Sia v7091 sia v6903 mostrano

la tendenza di diminuire il tasso di dissociazione con livelli di cattura di superficie crescenti; tuttavia, la correlazione è significativa con la variante Fab-scFv (v7091; valore $P = 0,023$) ma non con il formato Fab-Fab (v6093; valore $P = 0,053$). Il tasso di dissociazione è rimasto invariato con livelli di cattura di anticorpo variabili per il controllo monospecifico anti-HER2, v506.

La Figura 47B mostra il grafico e l'analisi di regressione lineare per la K_D (M) a differenti livelli di cattura dell'anticorpo con v6903 e v7091. Analogamente al confronto del tasso di dissociazione, sia v7091 che v6093 mostrano la tendenza ad aumentare l'affinità (valore K_D inferiore) con livelli di cattura sulla superficie crescenti. Tuttavia, la correlazione è significativa con la variante Fab-scFv (v7091; valore $P = 0,04$) ma non con il formato Fab-Fab (v6093; valore $P = 0,51$). La K_D è rimasta invariata con livelli di cattura di anticorpo variabili per il controllo monospecifico anti-HER2, v506. I dati nella Figura 47 mostrano che i formati di anticorpo biparatopico Fab-Fab e Fab-scFv anti-HER2 mostrano le tendenze di diminuire i tassi di dissociazione con livelli di cattura di superficie di anticorpo crescenti; queste tendenze sono uniche rispetto a un anticorpo anti-HER2 monospecifico.

Esempio 44: Ingegnerizzazione di affinità e stabilità di Fab di Pertuzumab

Come indicato nella Tabella 1, una variante (v10000) contiene mutazioni nel Fab di Pertuzumab. Questo Fab è stato ricavato da sforzi di ingegneria dell'affinità e della stabilità in silico, che sono stati misurati sperimentalmente come anticorpi monovalenti o One-Armed Antibodies (OAA).

Variante 9996: un anticorpo anti-HER2 monovalente, in cui il dominio di legame a HER2 è un Fab ricavato da pertuzumab sulla catena A, con Y96A nella regione VL e T30A/A49G/L69F nella regione VH (numerazione Kabat) e la regione Fc è un eterodimero avente le mutazioni T350V_L351Y_F405A_Y407V (numerazione EU) nella Catena A, T350V_T366L_K392L_T394W (numerazione EU) nella Catena B, e la regione cerniera della Catena B avente la mutazione C226S; il dominio legante l'antigene si lega al dominio 4 di HER2.

Variante 10014: un anticorpo anti-HER2 monovalente, in cui il dominio di legame a HER2 è un Fab ricavato da pertuzumab sulla catena A, con Y96A nella regione VL e T30A nella regione VH (numerazione Kabat) e la regione Fc è un eterodimero avente le mutazioni T350V_L351Y_F405A_Y407V (numerazione EU) nella Catena A, T350V_T366L_K392L_T394W (numerazione EU) nella Catena B, e la regione cerniera della Catena B avente la mutazione C226S; il dominio legante l'antigene si lega al dominio 4 di HER2.

Variante 10013: un anticorpo anti-HER2 monovalente, in cui il dominio di legame a HER2 è un Fab ricavato da pertuzumab wild-type sulla catena A, e la regione Fc è un eterodimero avente le mutazioni T350V_L351Y_F405A_Y407V (numerazione EU) nella Catena A, T350V_T366L_K392L_T394W (numerazione EU) nella Catena B, e la regione cerniera della Catena B avente la mutazione C226S; il dominio

legante l'antigene si lega al dominio 4 di HER2.

I seguenti esperimenti sono stati eseguiti per confrontare l'affinità di legame a HER2 e la stabilità delle varianti di Pertuzumab ingegnerizzate.

Le varianti di OAA sono state clonate ed espresse come descritto nell'Esempio 1.

Gli OAA sono stati purificati mediante cromatografia su proteina A e cromatografia ad esclusione dimensionale, come descritto nell'Esempio 1.

La purezza dell'eterodimero (vale a dire la quantità di OAA con un Fc eterodimerico) è stata valutata mediante saggio di espressione proteica ad alta potenzialità produttiva non riducente usando Caliper LabChip GXII (Perkin Elmer #760499). Le procedure sono state eseguite secondo il manuale d'uso HT Protein Express LabChip User Guide version2 LabChip GXII, con le seguenti modifiche. Campioni di eterodimero, a 2 µl o 5 µl (intervallo di concentrazione 5-2000 ng/µl), sono stati aggiunti a pozzetti separati in piastre a 96 pozzetti (BioRad # HSP9601) insieme a 7 µl di tampone campione HT Protein Express (Perkin Elmer # 760328). In seguito, i campioni di eterodimero sono stati denaturati a 70 °C per 15 minuti. Lo strumento LabChip è azionato usando il chip di HT Protein Express (Perkin Elmer #760499) e l'impostazione del saggio Ab-200. Dopo l'uso, il chip è stato pulito con acqua MilliQ e conservato a 4 °C.

La stabilità dei campioni è stata valutata misurando la temperatura di fusione o Tm, come determinato da DSC con il protocollo mostrato nell'esempio 24. Il DSC è stato misurato prima e dopo la purificazione SEC.

L'affinità verso ECD di HER2 dei campioni è stata misurata mediante SPR seguendo il protocollo dall'esempio 12. La SPR è stata misurata prima e dopo la purificazione SEC. Come riepilogato nelle Tabelle 47A e 47B, le mutazioni nel dominio variabile hanno aumentato l'affinità verso HER2 di Fab rispetto a pertuzumab wild-type, mantenendo la stabilità WT. (¹ Purezza determinata mediante Caliper LabChip; ² KD(WT)/KD(mut)

Tabella 47A:

variante di OAA	Mutazioni Fab HC	mut. LC	Resa Pr-A (mg/l)	SPR pre-SEC				Purezza post - SEC ¹	Het	SPR post-SEC			
				KD AVE (nM)	KD STDEV (nM)	n	Volte rispetto a WT ²			KD AVE (nM)	KD STDEV (nM)	n	Volte rispetto a WT
v9996	T30A/A49G/L69F	Y96A	22	1.7E-09	1.7E-10	5	9.6	93%		1.8E-09	1.6E-11	2	8.4
v10014	T30A	Y96A	20	2.0E-09	3.1E-10	4	8.1	81%		2.1E-09	5.2E-10	3	7.0
v10013	WT	WT	18	1.6E-08	5.1E-09	16	1.0	91%		1.5E-08	3.5E-09	4	1.0

Tabella 47B:

variante di OAA	DSC pre-SEC		DSC post-SEC	
	Tm (C)	ΔTm rispetto a WT (C)	Tm (C)	ΔTm rispetto a WT (C)
v9996	77.2	-0.2	77.2	-0.7
v10014	75.5	-1.9	75.5	-2.4
v10013	77.4	0.0	77.9	0.0

I reagenti impiegati negli esempi sono generalmente disponibili in commercio o possono essere preparati usando la strumentazione disponibile in commercio, e i metodi o i reagenti noti nella tecnica. I precedenti esempi illustrano vari aspetti descritti nella presente e la concretizzazione dei metodi descritti nella presente. Gli esempi non sono destinati a fornire una descrizione esaustiva delle molteplici forme di realizzazione dell'invenzione.

TABELLA DELLE SEQUENZE

Variante	Nome del clone H1	Nome del clone H2	Nome del clone L1	Nome del clone L2
792	1011	1015	-2	-2
5019	3057	720	1811	ND
5020	719	3041	ND	1811
7091	3057	5244	1811	ND
10000	6586	5244	3382	ND
6903	5065	3468	5037	3904
6902	5065	3468	5034	3904
6717	3317	720	ND	ND
1040	4560	4553	ND	4561
630	719	716	ND	ND
4182	4560	3057	ND	1811
506	642	642	-2	-2
4184	3057	3041	1811	1811
9996	4372	6586	ND	3382

SEQ ID NO.	Clone	Desc.	Sequenza (amminoacido o
1	642	Completo	EVQLVE SGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEPEVTCVVDVDSHE DPEVKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWEWSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	642	Completo	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCCG CGCTTCAGGATCAACATCAAGGACACCTACATTCAGTGGGTGCAGCAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC CGCTGTGTACTATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAAGCTCCGCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCTTGGCTCCTCTAGTAAA

			TCCACCTCTGGAGGGACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGT GAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTTCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGC TGACTCCCTGTCTCTGTGGTGACAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAAC GTGAATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAGACCCA CACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGTGTGGGAGGACCTAGCGTGTCTCTGTTCCCCCTAAGC CAAAAGACTCTGTATGATTTCCAGGACTCCGAGGTGACCTCGGTGGTGGTGGAGTGTCTCACGAG GACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAG AGAGGAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAAGTCAAGTAAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCT AAGGCCAAAGGCCAGCCAGGGAGCCCGAGGTGTACACTGCCACCCAGCAGAGACGAAGTACCAA GAACAGGTGTCCGTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGATATGCTGTGGAGTGGGAAT CAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTC CTGTATTCGAAGTGCAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTAGTTGTTACAGTGAT GCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
3	642	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQTLVTVSS
4	642	VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCAACATCAAGGACACCTACATTCCTGCGGTGCGCAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCGGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTCGCAGCCGAAGATAC CGCTGTACTATTGCAGTGCATGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAGCTCC
5	642	H1	GFNIKDTY
6	642	H1	GGATTCAACATCAAGGACACCTAC
7	642	H3	SRWGGDGFYAMDY
8	642	H3	AGTTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTAT
9	642	H2	IYPTNGYT
10	642	H2	ATCTATCCCACTAATGGATACACC
11	642	CH1	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTEPAVLQSSGLYLSLV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV
12	642	CH1	GCCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGACAGC CGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCC TGACAAGCGGAGTGACACTTTTTCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTG GTGACAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCATAAGCCCTCAA TACAAAAGTGGACAAGAAAGTG
13	642	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
14	642	CH2	GCTCCAGAAGTGTGGGAGGACCTAGCGTGTCTCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCC ACTTATCGCGTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCAGGACTGGTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAAGTAAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
15	642	CH3	

			GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPG
16	642	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCCAGCAGAGACGAAGTACCACAGAACCAGGT GTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTCCTGTATTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTAGTTGTTTCAGTGATGCATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC
17	3468	Completo	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKGYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLKSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPG
18	3468	Completo	GAAGTGCAGCTGGTCAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCTGG AGTGGGTCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTC ACCTGTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAACACCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGACTATTGCGCCCGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAATC TGGTCAACCGTGAGCTCCGCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCC ACATCTGGGGAACTGCAGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGGCTACTTCCAGAGCCCGTCACAGTGTCT TTGGAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCCTGCAGTGTGAAGTCAAGCGGGCTGT ACAGCCTGTCTGTGGTCAACCGTGCCAAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACCGTG AATCACAAGCCATCCAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAAACCAAGTCTTGTGATAAAACCCATAC ATGCCCCCTTGTCTCGCACAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTCCACCCCAAGCCTA AAGATACACTGATGATTAGTAGGACCCAGAAAGTCAATGCGTGGTCTGCGGAGCTGAGCCACAGGAGC CCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGA GGAAACAGTACAACAGTACCTATCGCGTGTGTCAGTCTGACAGTGTGCATCAGGATTGGCTGAACG GGAAAGAGTATAAGTGAAGTGAACAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAAAATTTCCAAG GCAAAAGGACAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAA CCAGGTGAGCCTGTGTCTGGTGAAGGATTTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTA ATGGCCAGCCTGAGAACAAATACCTGACCTGGCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTG TATAGCAAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTTCAGTCATGCA CGAGGCACTGCACAACCATACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTACCAGGG
19	3468	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSS
20	3468	VH	GAAGTGCAGCTGGTCAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCTGG AGTGGGTCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTC ACCTGTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAACACCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGACTATTGCGCCCGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAATC TGGTCAACCGTGAGCTCC
21	3468	H1	GFTFTDYT
22	3468	H1	GGCTTCACTTTTACCGACTACACC
23	3468	H3	ARNLGPSFYFDY

24	3468	H3	GCCCCGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTAT
25	3468	H2	VNPNSGGS
26	3468	H2	GTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCC
27	3468	CH1	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKGYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK
28	3468	CH1	GCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGAACTGC AGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGGCTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTCTTGGAACAGTGGCGCTC TGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCCCTGCAGTGTGAAGTCAAGCGGCTGTACAGCCTGTCTCTGTG GTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG
29	3468	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
30	3468	CH2	GCACCAGAGTGTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTTTCCACCAAGCCTAAAGATACACTGATGAT TAGTAGGACCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCGAAGTCAAGTTTA ACTGGTACGTGGACGGCGTGCAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGGAAACAGTACAACAGT ACCTATCGCGTCGTGTGAGTCCCTGACAGTGTGCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAAGATATAAGTG CAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCAAAA
31	3468	CH3	GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	3468	CH3	GGACAGCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAACCCAGGT CAGCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGATCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAATGGCC AGCCTGAGAACAAATACCTGACCTGGCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTGTATAGC AAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTAGTTGTTGAGTCAATGACAGGGC ACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCAACAGGG
33	1811	Completo	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGAPKLLIYSASYRYTGVPSPRFGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
34	1811	Completo	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTACCATCACATG CAAGGCTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGCACCCCAAGC TGCTGATCTATAGCCCTCTACCGGTATACCGGCGTGCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTGAGGA ACAGACTTTACTCTGACCATCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCATATACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCTCCCT CCGTCTCATTTTTCCCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTG AACAAATTTCTACCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGAAGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTGTCAAGCACACTGACTCTGA GCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTCCACACATCAGGGCTGTCTCTCCT GTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
35	1811	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGAPKLLIYSASYRYTGVPSPRFGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK

36	1811	VL	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCCTCAGTGGGCGACCGAGTACCATCACATG CAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGC TGCTGATCTATAGCGCCTCCTACCGGTATACCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTGAGGA ACAGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACCTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCATATACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAG
37	1811	L1	QDVSIG
38	1811	L1	CAGGATGTGTCTATTGGA
39	1811	L3	QYYIYPYT
40	1811	L3	CAGCAGTACTATATCTACCCATATAACC
41	1811	L2	SAS
42	1811	L2	AGCGCCTCC
43	1811	CL	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
44	1811	CL	AGGACTGTGGCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGC CAGCGTGGTCTGTCTGTGAACAATTTCTACCCCTCGCGAAGCCAAAGTGCGATGGAAGGTGATAACG CTCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTG TCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCAAGTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTACACACA TCAGGGGCTGTCTCTCTGTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
45	5034	Completo	DYKDDDDKDIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASFLYSGVPS RFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTT PPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEKLSG TASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTLKADYKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
46	5034	Completo	GACTACAAAGACGACGATGACAAAGATATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCGCTTCTGT GGGCGATAGGGTCACTATTACCTGCCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCCGCTGGTACCAGC AGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGCTGTGATCTACAGTGCATCATTCCTGTATTGAGGAGTGGCCAGC CGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGCACCGATTTACACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTT TGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTATAACCACACCCCTACTTTCCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGA TCAAGCGAAGTGTGGCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGAAGTCCGGC ACAGCTTCTGTGGTCTGTCTGTGAACAATTTTACCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAAGGTGGA CAACGCTCTGCAGAGTGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAAGACTCTACTTATA GTCTGTCAAGCACCCCTGACACTGAGCAAGGCAAGTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTC ACACATCAGGGGCTGTTCATCACCAGTACCAAATCATTCAATCGGGGGGAGTGC
47	5034	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTT PPTFGQGTKVEIK
48	5034	VL	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTCACTATTACCTG CCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCCGCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGC TGCTGATCTACAGTGCATCATTCTGTATTGAGGAGTGGCCAGCGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGC ACCGATTTACACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCTACTTTCCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
49	5034	L1	QDVNTA
50	5034	L1	CAGGACGTGAACACCGCA
51	5034	L3	QQHYTTPPT
52	5034	L3	CAGCAGCACTATAACCACACCCCTACT
53	5034	L2	SAS

54	5034	L2	AGTGCATCA
55	5034	CL	RTVAAPSVFI FPPS DERLKS GTASV VCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS SSTLTLKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
56	5034	CL	CGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGAAGTCCGGCACAGC TTCTGTGGTCTGTCTGTGAACAATTTTTACCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGAAGGTTCGACAACG CTCTGCAGAGTGGCAACAGCAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAAGACTCTACTTATAGTCTG TCAAGCACCTGACACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTACACA TCAGGGGCTGTATCACCAGTACCAAAATCATTCAATCGGGGGAGTGC
57	5037	Completo	DYKDDDDKDIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYTTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI FPPS DERLKS TASV VCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSKESVTEQDSKDSTYSLSRRLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
58	5037	Completo	GACTACAAAGACGACGATGACAAAGATATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGT GGGCGATAGGGTCACTATTACCTGCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCGCCTGGTACCAGC AGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGCTGCTGATCTACAGTGCATCATTCTGTATTCAGGAGTCCCAGC CGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGCACCGATTTACACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTT TGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTATACCACACCCCCTACTTTCCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGA TCAAGCGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGAAGTCCGGC ACAGCTTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGAAGGTGGA CAACGCTCTGCAGAGTGGCAACAGCAAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAAGACTCTACTTATA GTCTGTCAAGCAGACTGACACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTG ACACATCAGGGGCTGTATCACCAGTACCAAAATCATTCAATCGGGGGAGTGC
59	5037	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYTTPPTFGQGTKEIK
60	5037	VL	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTCACTATTACCTG CCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGC TGCTGATCTACAGTGCATCATTCTGTATTCAGGAGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGC ACCGATTTCACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCCTACTTTCCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
61	5037	L1	QDVNTA
62	5037	L1	CAGGACGTGAACACCGCA
63	5037	L3	QQHYTTPPT
64	5037	L3	CAGCAGCACTATAACCACACCCCCTACT
65	5037	L2	SAS
66	5037	L2	AGTGCATCA
67	5037	CL	RTVAAPSVFI FPPS DERLKS GTASV VCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSKESVTEQDSKDSTYSLS SSRRLTLKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
68	5037	CL	CGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGAAGTCCGGCACAGC TTCTGTGGTCTGTCTGTGAACAATTTTTACCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGAAGGTTCGACAACG CTCTGCAGAGTGGCAACAGCAAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAAGACTCTACTTATAGTCTG TCAAGCAGACTGACACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTACACA TCAGGGGCTGTATCACCAGTACCAAAATCATTCAATCGGGGGAGTGC

69	3382	Completo	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGAPKLLIYSASYRYTGVPFRFSGSGS TDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPATFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
70	3382	Completo	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTACCATCACATG CAAGGCTTCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGCACCACAGC TGCTGATCTATAGCGCTCCTACCGGTATACCGGCGTGCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTGAGGA ACAGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCAGCCACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCTCCCT CCGTCTCATTTTTCCCTCTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGTG AACAAATTTCTACCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGAAGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTGTCAAGCACACTGACTCTGA GCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTCACACATCAGGGGCTGTCTCTCCT GTGACTAAGACTTTAACAGAGGAGAGTGT
71	3382	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGAPKLLIYSASYRYTGVPFRFSGSGS TDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPATFGQGTKEIK
72	3382	VL	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTACCATCACATG CAAGGCTTCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGCACCACAGC TGCTGATCTATAGCGCTCCTACCGGTATACCGGCGTGCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTGAGGA ACAGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCAGCCACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAG
73	3382	L1	QDVSIG
74	3382	L1	CAGGATGTGTCTATTGGA
75	3382	L3	QYYIYPAT
76	3382	L3	CAGCAGTACTATATCTACCCAGCCACC
77	3382	L2	SAS
78	3382	L2	AGCGCTCC
79	3382	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
80	3382	CL	AGGACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTCATTTTTCCCTCTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGC CAGCGTGGTCTGTCTGTGAACAATTTCTACCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGAAGGTCGATAACG CTCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTG TCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTCACACA TCAGGGGCTGTCTCTCCTGTGACTAAGACTTTAACAGAGGAGAGTGT
81	5065	Completo	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLPSSK STSGGTAALGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIIS KAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFA LVSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
82	5065	Completo	

			GAGGTGCAGCTGGTCGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCACCTGCAGACTGAGCTGCGC AGCTTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTCCGCCAGGCTCCTGAAAAGGCCTGG AGTGGGTGGCACGAATCTATCCAATAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATTTCGCAGATACAAGTAAAAACACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTCGCAGCCGAAGATAC AGCCGTGTACTATTGCAGCCGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGCAGGGAA CCCTGGTCACAGTGAGCTCCGCATCAACAAAGGGGCTAGCGTGTTCCTACTGGCCCCCTCTAGTAAA TCCACCTCTGGGGAAACAGCAGCCCTGGGATGTGAGGTGACCGACTACTTCCAGAGCCCGTCACTGT GAGCTGGAACCTCCGGCCCTGACATCTGGGGTCCATACTTTTCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGCC TGTACAGCCTGTCTCTGTGGTCACTGTGCCAAGTTCAGCCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCATCCAATACCAAGTCGACAAGAAAGTGAACCCCAAGTCTTGTGATAAAACACA TACTTGGCCCCCTTGTCTGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCAAGC CTAAGACACCCCTGATGATTAGTAGGACTCCAGAAGTCACTGCGTGGTCTGCTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGA GACCCCGAAGTCAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCAG GGAGAACAGTACAACCTCACTTATCGCGTCTGTCTGTCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGCAAGGAGTATAAGTCAAAGTGAACAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCC AAGGCTAAAGGGCAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCTCCATCTAGGGACGAGCTGACCAA GAACAGGTCACTGTGACATGTCTGGTGAAGGGTCTATCCCAGCGATATCGCAGTGGAGTGGGAAT CCAATGGACAGCCTGAGAACAAATACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGAAGTTTCCGCC CTGGTGAAGTAAAGCTGACCGTCGATAAATCACGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGTTCACTGAT GCACGAAGCACTGCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGTCCCCCGCC
83	5065	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS
84	5065	VH	GAGGTGCAGCTGGTCGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCACCTGCAGACTGAGCTGCGC AGCTTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTCCGCCAGGCTCCTGAAAAGGCCTGG AGTGGGTGGCACGAATCTATCCAATAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATTTCGCAGATACAAGTAAAAACACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTCGCAGCCGAAGATAC AGCCGTGTACTATTGCAGCCGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGCAGGGAA CCCTGGTCACAGTGAGCTCC
85	5065	H1	GFNIKDTY
86	5065	H1	GGCTTCAACATCAAGGACACCTAC
87	5065	H3	SRWGGDGFYAMDY
88	5065	H3	AGCCGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTAT
89	5065	H2	IYPTNGYT
90	5065	H2	ATCTATCCAATAATGGATACACC
91	5065	CH1	ASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
92	5065	CH1	GCATCAACAAAGGGGCTAGCGTGTTCCTACTGGCCCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGGGAAACAGC AGCCCTGGGATGTGAGGTGACCGACTACTTCCAGAGCCCGTCACTGTGAGCTGGAACCTCCGGCGCCC TGACATCTGGGGTCCATACTTTTCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGCCGTGACAGCCTGTCTCTGTG GTCACTGTGCCAAGTTCAGCCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAA TACCAAAGTCGACAAGAAAGTG
93	5065	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
94	5065	CH2	

			GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGATGAT TAGTAGGACTCCAGAAGTCACTCGCGTGGTTCGTCGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCC ACTTATCGCGTCTGTCTGTCTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTG CAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCTAAA
95	5065	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
96	5065	CH3	GGGAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCCTCCATCTAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGTCTGACATGTCTGGTGAAGGGTTCTATCCCAGCGATATCGCAGTGGAGTGGGAATCCAATGGAC AGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCTGATGGAAGTTTCGCCCTGGTGAGT AAGCTGACCGTCGATAAATCACGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGTTACAGTATGCACGAAGC ACTGCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGTCCCCCGG
97	6586	Completo	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYTMQWRQAPGKLEWVGDVNPNSGGSIYNQRFKGRF TFSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSEFYFDYWGQGLVTVSSASTKGSVFEPLAPSSKS TSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNV NPKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISK AKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFAL VSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
98	6586	Completo	GAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGAGGGGGCCTGGTGCAGCCCGAGGGTCTCTGCGACTGTCATGTGC CGCTTCTGGGTTCACTTTCGAGACTACACAATGGATTGGGTGCGCAGGCCCCCGAAAGGGACTGG AGTGGGTGGGCGATGTCAACCCATAATCTGGCGGGAGTATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGGAGATTC ACTTTTTAGTGGACAGAAGCAAAAACCCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAAGATAC CGCTGTCTACTATTGCGCTCGCAATCTGGGCCCCAGTTTCTACTTTGACTATTGGGGCAGGGAACCC TGGTGACAGTCACTCCGCTAGCACTAAGGGGCCTCCGTTTCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCC ACCTCTGGAGGCACAGTGCAGTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACAGTCAACAGTGA TTGGAAGTCAAGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTCCCGCAGTGTGCAGTCAAGCGGACTGT ACTCCCTGTCTCTGTGGTCAACGTCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACGTG AATCACAAAGCCATCAAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAAACTCATA CTGCCACCTTGTCCGGCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTCCACCCAAAGCCTA AAGACACCCTGATGATTTCCCGGACTCCTGAGGTCACTGCGTGGTGGTGGAGCTGTCTCAGGAGGAC CCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAAACCCCGGGA GGAACAGTACAACCTCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTCTGACAGTGTGCACCAGGACTGGCTGAATG GGAAGGAGTATAAGTGTAAAGTGAAGCAACAAAGCCCTGCCCGCCCCAATCGAAAAACAATCTCTAAA GCAAAAGGACAGCCTCGCGAACCACAGGTCTACGTCTACCCCCATCAAGAGATGAAGTGAACAAAAA TCAGGTCTCTGACATGCCTGGTCAAAGGATTTACCCCTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTA ACGGCCAGCCGAGAACAAATACAAGACCACACCCCTGTCTGGACTCTGATGGGAGTTTCGCTCTG GTGTCAAAGCTGACCGTCGATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTAGTGTCTCGTCAATGCA CGAAGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
99	6586	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYTMQWRQAPGKLEWVGDVNPNSGGSIYNQRFKGRF TFSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSEFYFDYWGQGLVTVSS
100	6586	VH	

			GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGGGGCCTGGTGCAGCCCGAGGGTCTCTGCGACTGTCATGTGC CGCTTCTGGGTTCACTTTCGCAGACTACACAATGGATTGGGTGCGACAGGCCCCCGAAAGGGACTGG AGTGGGTGGGCGATGTCAACCCTAATTCTGGCGGGAGTATCTACAACCAGCGGTCAAGGGGAGATTC ACTTTTTAGTGGACAGAAGCAAAAACACCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAAGATAC CGCTGTACTATTTGCGCTCGCAATCTGGGCCCCAGTTTCTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCC TGGTGACAGTCAGCTCC
101	6586	H1	GFTFADYT
102	6586	H1	GGGTTCACTTTTCGCAGACTACACA
103	6586	H3	ARNLGPFSFYFDY
104	6586	H3	GCTCGCAATCTGGGCCCCAGTTTCTACTTTGACTAT
105	6586	H2	VNPNSGGS
106	6586	H2	GTCAACCCTAATTCTGGCGGGAGT
107	6586	CH1	ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK
108	6586	CH1	GCTAGCACTAAGGGGCCTTCCGTGTTCCACTGGCTCCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGC TGCACTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTACAGTGAAGTGGAACTCAGGGGCTC TGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCGCAGTGTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCTCTGTG GTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCAAGCCATCAAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG
109	6586	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
110	6586	CH2	GCGCCAGAAGTCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCCAAGCCTAAAGACACCCTGATGAT TTCCCGGACTCCTGAGGTCAACCTGCGTGGTGGACGTGTCTCAGGAGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCCAAGACCAACCCCGGAGGAACAGTACAACCTCT ACCTATAGAGTCTGAGTGTCTGACAGTGTGCACCAGGACTGGTGAATGGGAAGGAGTATAAGTG TAAAGTGAACAACAAGCCCTGCCCGCCCAATCGAAAAACAATCTCTAAAGCAAAA
111	6586	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
112	6586	CH3	GGACAGCCTCGCAACCACAGGTCTACGTCTACCCCCATCAAGAGATGAACTGACAAAAAATCAGGT CTCTCTGACATGCTGGTCAAAGGATCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAAACGGCC AGCCCGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTCTGGACTCTGATGGGAGTTTCGCTCTGGTGTCA AAGCTGACCGTCGATAAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTTAGCTGCTCCGTCATGCACGAAGC CCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
113	3904	Completo	YPYDVPDYATGSDIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRYT GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEE LKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSEESVTEQDSKDYSLSSSTLELSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
114	3904	Completo	

			TATCCCTACGATGTGCCTGACTACGCTACTGGCTCCGATATCCAGATGACCCAGTCTCCAAGTCCCT GAGTGCATCAGTGGGGACCGAGTACCATCACATGCAAGGCTCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCG CATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAAGCTGCTGATCTACAGCGCCTCTACCGGTATACT GGGGTGCCTTCCAGATTCTCTGGCAGTGGGTGAGAACCGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCA GCCCAGGATTTGCCACCTACTATTGCCAGCAGTACTATATCTACCCCTTATACCTTTGGCCAGGGGA CAAAAGTGGAGATCAAGAGGACAGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCCCCTTCCGACGAGAG CTGAAAAGTGGAACTGCTTCAAGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCCGCGAAGCCAAAGTGA GTGGAAGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGCAATTCGAGGAGTCTGTGACAGAACAGGACAGTAAAG ATTCAACTTATAGCCTGTCAAGCACACTGGAGCTGTCTAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTAT GCCTGCGAAGTACCCATCAGGGGCTGTCTCTCCCGTGACAAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
115	3904	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFRSGSGS TDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKEIK
116	3904	VL	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCTGAGTGCATCAGTGGGGACCGAGTACCATCACATG CAAGGCTTCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAAGC TGCTGATCTACAGCGCCTCTACCGGTATACTGGGGTGCCTTCCAGATTCTCTGGCAGTGGGTGAGG ACCGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCGAGGATTTGCCACCTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCCTTATACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAG
117	3904	L1	QDVSIG
118	3904	L1	CAGGATGTGTCTATTGGA
119	3904	L3	QYYIYPYT
120	3904	L3	CAGCAGTACTATATCTACCCCTTATAACC
121	3904	L2	SAS
122	3904	L2	AGCGCCTCC
123	3904	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEELKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWIKVDNALQSGNSEESVTEQDSKSTYSL SSTLELSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
124	3904	CL	AGGACAGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCCCCTTCCGACGAAGAGCTGAAAAGTGGAACTGC TTCAGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGGAAAGTTCGATAACG CTCTGCAGAGCGGCAATTCGAGGAGTCTGTGACAGAACAGGACAGTAAAGATTCAACTTATAGCCTG TCAAGCACACTGGAGCTGTCTAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTACCCCA TCAGGGGCTGTCTCTCCCGTGACAAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
125	4553	Completo	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKVEPKSCKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI S KAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFA LVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK
126	4553	Completo	

			GAAGTCCAGCTGGTCGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATTCAGTGGGTGCGCCAGGCTCCTGAAAAGGCGCTGG AGTGGGTGGCAGCAATCTATCCAATAATGGATACACCCGGTATGCAGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATTAGCGCAGATACATCCAAAAACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGCCGGAAGATA TGCTGTGTACTATTCAGTCCGTGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGCAGGGAA CCCTGGTCACAGTGAGCTCCGCATCTACAAAGGGGCTAGTGTGTTTCCACTGGCCCCCTCTAGTAAA TCCACCTCTGGGGAAACAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTCCAGAGCCCGTCACTGT GAGTTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACATCCGGGGTCCATACTTTTCTGCTGTGTGCAGTCAAGCGGCC TGACTCTCTGTCTCTGTGGTCACCGTGCCAAGTTCAGCCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAAC GTGAATCACAAAGCAAGCAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGAACCCCAAGAGCTGTGATAAAACACA TACTTGGCCCCCTTGTCTGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTGTTCCACCCAAAGC CTAAAGACACCCCTGATGATTCCAGGACTCCAGAAGTCACTCGCTGGTGGTGGAGCTGTCTCACGAG GACCCCAAGTCAAGTTCAGTGGTACGTGGATGGCGTCGAGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCAG GGAGAACAGTACAACCTCACTTATCGCGTCTGTGAGCGTCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGAAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACCATTAGC AAGCCAAAGGGCAGCCTAGAGAACCACAGGCTACGTGTATCCTCCAAGCAGGACGAGCTGACCAA GAACAGGCTCTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGGTTTACCCAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAAT CAATGGACAGCCTGAAAACAATTATAAGACCACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCGCT CTGGTCTCCAGCTGACTGTGGATAAATCTCGGTGGCAGCAGGGCAACGCTCTTAGTTGTTCAAGTGT GCATGAGGCACTGCACAATCATTACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAA
127	4553	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS
128	4553	VH	GAAGTCCAGCTGGTCGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATTCAGTGGGTGCGCCAGGCTCCTGAAAAGGCGCTGG AGTGGGTGGCAGCAATCTATCCAATAATGGATACACCCGGTATGCAGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATTAGCGCAGATACATCCAAAAACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGCCGGAAGATA TGCTGTGTACTATTCAGTCCGTGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGCAGGGAA CCCTGGTCACAGTGAGCTCC
129	4553	H1	GFNIKDTY
130	4553	H1	GGCTTCAACATCAAGGACACCTAC
131	4553	H3	SRWGGDGFYAMDY
132	4553	H3	AGTCCGGTGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTAT
133	4553	H2	IYPTNGYT
134	4553	H2	ATCTATCCAATAATGGATAACCC
135	4553	CH1	ASTKGPSVFPFLPSSKSTSGGTAALGCI.VKDYFPE.PVTVSWNSGAT.TSGVHTFPAVI.QSSGI.YSI.SSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV
136	4553	CH1	GCATCTACAAAGGGGCTAGTGTGTTTCCACTGGCCCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGGGAAACAGC AGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTCCAGAGCCCGTCACTGTGAGTTGGAAGTCAAGGCGCCC TGACATCCGGGGTCCATACTTTTCTGCTGTGTGCAGTCAAGCGGCCCTGACTCTCTGTCTCTGTG GTCACCGTGCCAAGTTCAGCCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTGAATCAAGCCAAAGCAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG
137	4553	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
138	4553	CH2	

			GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCTCTGTTTCCACCCCAAGCCTAAAGACACCCTGATGAT TTCCAGGACTCCAGAAGTACACCTGCGTGGTTCGTGGACGTGTCTCACCAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGCAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCA ACTTATCGCGTTCGTGAGCGTCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGTGAACGGCAAGGAGTATAAGTG CAAAGTGAACAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACCATTAGCAAGGCCAAA
139	4553	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
140	4553	CH3	GGGCAGCCTAGAGAACCACAGGTCTACGTGTATCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGT CTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGGTTTTACCCAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCTGAAAACAATTATAAGACCACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCGCTCTGGTCTCC AAGCTGACTGTGGATAAATCTCGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTTAGTTGTTTCAGTGATGCATGAGGC ACTGCACAATCATTACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGG
141	716	Completo	EPKSSDKHTCPPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLI CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQ GNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
142	716	Completo	GAGCCCAAGAGCAGCGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGTCTGGGAGGACC TAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCT GCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACCAGGACCCGAAGTGAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAA GTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTTCGTGAGCGTGT GACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAAGTAAATAGGCCCTGC CTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCGAGGTACACACTG CCACCCAGCAGAGCAACTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGATCTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCC TAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACATGACCTGGCCTCCAG TGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAG GGGAACGTGTTTAGTTGTTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTC CCTGTCTCCCGGCAAA
143	716	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK
144	716	CH2	GCTCCAGAAGTCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACCAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCC ACTTATCGCGTTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCAGGACTGGTGAACGGCAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAAGTAATAAGGCCCTGCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
145	716	CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLI CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
146	716	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCCAGCAGAGACGAAGTCAAGCAAGACCAGGT GTCCCTGATCTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAGATACATGACCTGGCCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTTCAGTGATGCATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGG

147	719	Completo	DIQMTQSPSSLSASVGDVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFLTISSLQPEDFATYYCQHYHTPPTFGQGTKEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDFYAMDYWGQGLVTVSSAAEPKSSDKHTCPCPAPPELLGGP SVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDDEGSEFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSL LSPGK
148	719	Completo	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGCATCTGGG ACAGATTTACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCACCCACTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAAGTGGTCTGGTGGTGGTT CTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTCTGGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTACAGCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACATTAAGATAAC TTATATCCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTGCGCAGTATTATCCACAA ATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCGAGACACTTCCAAAGAAC ACCGGTATCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTTTATTAAGTGTCAAGATGGGG CGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCTGGTCCCGTCTCCTCAGCCGCGG AGCCCAAGAGCAGCGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGTCCAGAAGTCTGGGAGGACCT AGCGTGTCTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGAGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAAG TGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTGTGAGCGTGTG ACCGTGTGCACAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGAAGATCAGTAATAAGGCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCGAGGTGTACACATACC CACCAGCAGAGACGAACACTGACCAAGAACAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCT AGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAAATGGACAGCCAGAGAACAAATTAAGACACACCTCCAGT GCTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGG GGAACGTGTTAGTTGTTCAAGTGCATGAAGCCCTGCACAAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCC CTGTCTCCCGGCAAA
149	719	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFLTISSLQPEDFATYYCQHYHTPPTFGQGTKEIK
150	719	VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGCATCTGGG ACAGATTTACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCACCCACTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAA
151	719	L1	QDVNTA
152	719	L1	CAGGACGTTAACACCGCT
153	719	L3	QQHYHTPPT
154	719	L3	CAACAGCATTACACTACCCACCCACT
155	719	L2	SAS
156	719	L2	TCTGCATCC
157	719	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDFYAMDYWGQGLVTVSS
158	719	VH	

			GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCAACATTAAGATACTTATATCCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGGAAGGCCTGG AGTGGGTCGCACGTATTTATCCACAAAATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTTC ACCATCTCCGACAGACTTCCAAGAACACCGCGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACAC
			GGCCGTTTATTACTGTTC AAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGA CCCTGGTCACCGTCTCCTCA
159	719	H1	GFNIKDTY
160	719	H1	GGATTCAACATTAAGATACTTAT
161	719	H3	SRWGGDGFYAMDY
162	719	H3	TCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTAC
163	719	H2	IYPTNGYT
164	719	H2	ATTTATCCACAAAATGGTTACACA
165	719	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
166	719	CH2	GCTCCAGAAGTGTGGGAGGACCTAGCGTGTCTCTGTTTCCCCTAAGCCAAAAGACTCTGATGAT TTCAGGACTCCCAGGTGACCTGCGTGGTGGGACGTGTCTCAGGAGGACCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAAACAGTACAACCTCC ACTTATCGCGTGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAAGTAAAGGCCCTGCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
167	719	CH3	GQPREPQVYTYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDEGDSFALVS KLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
168	719	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCAGGTGTACACATACCCACCCAGCAGAGACGAAGTACCAAGAACAGGT GTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACTCCAGTGTGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTTCAAGTATGATGAAGC CCTGCACAATCATTACTCAGAAAGCCCTGTCCCTGTCTCCCGGC
169	720	Completo	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPAPPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY P SDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKLSL LSPGK
170	720	Completo	

			GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAAACAGGGAAAGCCCCAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTCGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCCACTTTCGGCCAAGGGACCAAGTGGAGATCAAAGTGGTCTGGTGGTGGTT CTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTCTGGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTGGTACAGCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACATTAAGATAAC TTATATCCACTGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGTGCAGCTATTATCCCAAA ATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCGAGACACTTCCAAGAAC ACCGCTATCTGCAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTTCAAGATGGGG CGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGACCTGGTACCCTCTCCTCAGCCGCG AGCCCAAGAGCAGCGATAAGACCCACACTGCCCTCCCTGTCCAGTCCAGAAGTCTGGGAGGACCT AGCGTGTCTCTGTTCCCTTAAGCCAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTG CGTGGTGGGAGTGTCTCACGAGGACCCGAAGTGAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAAG TGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCCATTATCGCGTCTGGAGCGTGTG ACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAAGTCAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAACCATCTTAAGGCCAAGGCCAGCCAAAGGAGCCCGAGGTGTACACACTGC CACCCAGCAGAGCGAACTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGATCTGTCTGGTAAAAGGCTTCTATCCT AGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACATGACCTGGCCTCCAGT GCTGGACAGCGATGGCAGCTCTTCTGTATTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGG
			GGAACGTGTTTAGTTGTTTCACTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCC CTGTCTCCCGCAAA
171	720	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGSRSG TDFLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK
172	720	VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAAACAGGGAAAGCCCCAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTCGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCCACTTTCGGCCAAGGGACCAAGTGGAGATCAA
173	720	L1	QDVNTA
174	720	L1	CAGGACGTTAACACCGCT
175	720	L3	QQHYTTPPT
176	720	L3	CAACAGCATTACACTACCCCACT
177	720	L2	SAS
178	720	L2	TCTGCATCC
179	720	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
180	720	VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCAACATTAAGATACTTATATCCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGG AGTGGGTGCAGTATTTATCCCAAAATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCGAGACACTTCCAAGAACACCGGTATCTGCAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACAC GGCCGTTTATTACTGTTCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTACTGGGGCAAGGGA CCCTGGTACCCTCTCCTCA
181	720	H1	GFNIKDTY
182	720	H1	GGATTCAACATTAAGATACTTAT
183	720	H3	SRWGGDGFYAMDY

184	720	H3	TCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTAC
185	720	H2	IYPTNGYT
186	720	H2	ATTTATCCCACAAATGGTTACACA
187	720	CH2	APELLGGPSVFLFPPPKDLMISRTEPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
188	720	CH2	GCTCCAGAAGTCTGGGAGGACCTAGCGTGTCTCTGTTTCCCCTAAGCCAAAAGACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCAGAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCC ACTTATCGCGTGGTGGAGCGTGTGACCGTGTGACCGTGTGACCGAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
189	720	CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLICLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
190	720	CH3	GGCCAGCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCCAGCAGAGACGAAGTGAACAGAACAGGT GTCCCTGATCTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAGATACATGACCTGGCCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGTTCTTCTGTATTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTTTCAGTGTGATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGC
191	4561	Completo	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFRSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
192	4561	Completo	GATATTAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGGGTCACTATCACCTG CCGCGCATCTCAGGATGTGAACACCCGAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGC TGCTGATCTACAGTGCATCATTCTGTATTTCAGGAGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCGACAGATCTGGC ACCGACTTCACACTGACTATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCTACTTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAGCGAAGTGTGGCCGCTCCAA GTGTCTTCAATTTTCCACCCAGCGACGAACAGCTGAAATCCGGCACAGCTTCTGTGGTCTGTCTGTG AACAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAAGTTCGATAACGCTCTGCAGAGTGGCAACAG CCAGGAGAGCGTACAGAACAGGACTCCAAAGATTCTACTTATAGTCTGTCAAGCACCCTGACACTGA GCAAGGCGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTGACCCATCAGGGGCTGTCTTCTCCC GTGACCAAGTCTTCAACCGAGGCGAATGT
193	4561	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFRSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK
194	4561	VL	GATATTAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGGGTCACTATCACCTG CCGCGCATCTCAGGATGTGAACACCCGAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGC TGCTGATCTACAGTGCATCATTCTGTATTTCAGGAGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCGACAGATCTGGC ACCGACTTCACACTGACTATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCTACTTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
195	4561	L1	QDVNTA
196	4561	L1	CAGGATGTGAACACCGCA
197	4561	L3	QQHYTTPPT

198	4561	L3	CAGCAGCACTATAACCACACCCCCTACT
199	4561	L2	SAS
200	4561	L2	AGTGCATCA
201	4561	CL	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS SSTLTLKSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
202	4561	CL	CGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCAATTTTTCCACCCAGCGACGAACAGCTGAAATCCGGCACAGC TTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAAGTTCGATAACG CTCTGCAGAGTGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCAAAGATTCTACTTATAGTCTG TCAAGCACCCCTGACACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTGACCCA TCAGGGGCTGTCTTCTCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGAGGCGAATGT
203	3041	Completo	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSTFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTVVVVDSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVLPISRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMHEALHNNHTQKSLSLSPG
204	3041	Completo	GAAGTGCAGCTGGTCAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGCAGAGCCACTGGAAGGGCCTGG AGTGGGTGCGCGATGTGAACCAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACAGCGGTTCAAGGGCCGGTTC ACCTGTGAGTGGACCGGAGCAAAAACACCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATA TGCTGTACTATTGCGCCCGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCGAGGAACTC TGGTCAACCGTGAAGTCCGCTCCACCAAGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCC ACATCTGGGGAACTGCAGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTACAGTGTG TTGGAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCTTCTGTCAGTGTGTCAGTCAAGCGGGCTGT ACAGCCTGTCTCTGTGGTCAACCGTGCAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTG AATCACAAGCCATCCAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGAACCCAAAGTCTTGTGATAAAACCCATA ATGCCCCCTTGTCTGACCCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTCCACCCAAAGCCTA AAGATACACTGATGATTAGTAGGACCCAGAAGTACATGCGTGGTCTGGACGTGAGCCACGAGGAC CCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGA GGAACAGTACAACAGTACCTATCGCGTGTGTGTCAGTCTGACAGTGTGATCAGGATTGGCTGAACG GGAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAACAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAG
			GCAAAAGGACAGCTTAGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAAGAA CCAGGTGAGCCTGTGTGTCTGGTGAAGGATTCTATCCCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTA ATGGCCAGCCTGAGAACAAATACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTG TATAGCAAGCTGACCGTGCACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTAGTTTTCAGTCATGCA CGAGGCACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCAACGAGG
205	3041	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSTFYFDYWGQGLVTVSS
206	3041	VH	

			GAAGTGCAGCTGGTTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCAGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCTGG AGTGGGTGCGCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTCAAGGGCCGGTTC ACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAACACCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTACTATTTGCGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAATC TGGTCACCGTGAGCTCC
207	3041	H1	GFTFTDYT
208	3041	H1	GGCTTCACTTTTACCAGACTACACC
209	3041	H3	ARNLGPFSFYFDY
210	3041	H3	GCCCCGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTAT
211	3041	H2	VNPNSGGS
212	3041	H2	GTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCC
213	3041	CH1	ASTKGGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK
214	3041	CH1	GCCFCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGAACTGC AGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTACAGTGTCTTGGAACAGTGGCGCTC TGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCTGAGTGTGCAAGTCAAGCGGCTGTACAGCCTGTCTCTGTG GTCACCGTGCCAGTTCAGCCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG
215	3041	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
216	3041	CH2	GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCCAAGCCTAAAGATACACTGATGAT TAGTAGGACCCAGAAAGTACATGCGTGGTTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTTA ACTGGTACGTGGACGGCGTGCAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACAGT ACCTATCGCGTCTGTGAGTCTGACAGTGTGCATCAGGATTGGTGAACGGGAAAGAGTATAAGTG CAAAGTGAACAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCAAAA
217	3041	CH3	GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
218	3041	CH3	GGACAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAAGAACAGGT CAGCCTGCTGTGCTGGTGAAGGATCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAATGGCC AGCCTGAGAACAAATACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTCTGTATAGC AAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTAGTTGTTGAGTCAATGACAGGC ACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCAACAGGG
219	3057	Completo	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKLEWVADVNPNSGGSIIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPFSFYFDYWGQTLVTVSSASTKGGPSVFLPAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGSPAL VSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
220	3057	Completo	

			GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCTGG AGTGGGTGCGCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAGGGCCGGTTC
			ACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAAACCCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGTACTATTGCGCCCGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAATC TGGTCACCGTGAGCTCCGCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCC ACATCTGGGGAACTGCAGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTCACAGTGT TTGGAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCTTCTGTCAGTGTGAGTCAAGCGGGCTGT ACAGCCTGTCTCTGTGGTACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTG AATCACAAGCCATCCAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGAACCCCAAGTCTTGTGATAAAAACCATA ATGCCCCCTTGTCTGCACAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTGTTTCCACCCCAAGCCTA AAGATACACTGATGATTAGTAGGACCCCGAAGTCAACATGCGTGGTGGAGTGGAGCCAGGAGAC CCCGAAGTCAAGTTAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGA GGAACAGTACAACAGTACCTATCGCGTGTGTGAGTCTGACAGTGTGATCAGGATTTGGCTGAACG GGAAAGAGTATAAGTCAAAGTGAACAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAAATTTCCAAG GCAAAAGGACAGCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGTATCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAA CCAGGTGAGCCTGACTTGTCTGGTGAAGGATTTATCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTA ATGGCCAGCCTGAGAACAAATACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTCGCGCTG GTGAGCAAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTTTCAGTCATGCA CGAGGCACTGCACAACCATACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCAACAGGG
221	3057	VH	EVQLVESGGGLVQPFGSLRLSCAASGFTFTDYMWRQAPGKLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSTFYFDYWGQGLVTVSS
222	3057	VH	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCTGG AGTGGGTGCGCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAGGGCCGGTTC ACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAAACCCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGTACTATTGCGCCCGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAATC TGGTCACCGTGAGCTCC
223	3057	H1	GFTFTDYT
224	3057	H1	GGCTTCACTTTTACCGACTACACC
225	3057	H3	ARNLGPSTFYFDY
226	3057	H3	GCCCGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTAT
227	3057	H2	VNPNSGGS
228	3057	H2	GTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCC
229	3057	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK
230	3057	CH1	GCCFCCACCAAGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGAACTGC AGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTCACAGTGTCTTGGAACAGTGGCGCTC TGACTTCTGGGGTCCACACCTTCTGTCAGTGTGAGTCAAGCGGGCTGTACAGCCTGTCTCTGTG GTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG
231	3057	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
232	3057	CH2	

			GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCCAAGCCTAAAGATACACTGATGAT TAGTAGGACCCCAAGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCAAGTCAAGTTTA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACAGT ACCTATCGCGTGTGTGAGTCTGACAGTGTGCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAAAGATATAAGTG CAAAGTGAACAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCAAAA
233	3057	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
234	3057	CH3	GGACAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGTATCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAGAACCAGGT CAGCCTGACTTGTCTGGTGAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAAATGGCC AGCCTGAGAACAAATACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCGCGCTGGTGGC
			AAGCTGACCGTCGACAAATCCCGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTGAGTATGCACGAGGC ACTGCACAACCATTACACCAGAAGTCACTGTCACTGTCAACAGGG
235	1011	Completo	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRADTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKVEPKSCKHTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIIS KAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFA LVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
236	1011	Completo	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCAACATCAAGGACACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCGATACATCCAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC CGCTGTGTACTATTGCAGTGCATGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCTGGCTCCCTCTAGTAAA TCCACCTCTGGAGGACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCTCCGAGCCTGTGACCGT GAGTTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGC TGTAATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAGACCCA CACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGC CAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGAGTGTCTCACGAG GACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAG AGAGGAACAGTACAACCTCACTTATCGCGTGGTGGAGCGTGTGACCGTGTGCACAGGACTGGCTGA ACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAAGTAAAGGCCCTGCCTGTCCAAATCGAAAAACCATCTCT AAGGCCAAAGGCCAGCAAGGGAGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAAGTACCAA GAACAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAAT CAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCGCC CTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTTTGTAGTTGTTGAGTGTGAT GCATGAAGCCCTGCACAATCATTAACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
237	1011	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRADTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS
238	1011	VH	

			GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCCTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC CGCTGTGTACTATGTCAGTCGATGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAGCTCC
239	1011	H1	GFNIKDTY
240	1011	H1	GGATTCAACATCAAGGACACCTAC
241	1011	H3	SRWGGDGFYAMDY
242	1011	H3	AGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTAT
243	1011	H2	IYPTNGYT
244	1011	H2	ATCTATCCCCTAATGGATACACC
245	1011	CH1	ASTKGPSVFLPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK
246	1011	CH1	GCCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGACAGC CGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGACCGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCC TGACAAGCGGAGTGACACACTTTTCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTG GTGACAGTGCCAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCATAAGCCCTCAA TACAAAAGTGGACAAGAAAGTG
247	1011	CH2	APEI.I.GGPSVFL.FPPKPKDTL.MTSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEFVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
248	1011	CH2	GCTCCAGAAGTGTGGGAGGACCTAGCGTGTCTCTGTTTCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACCTCC ACTTATCGCGTCTGTGAGCGTGTGACCGTGTGACCCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAAGTAAAGGCCCTGCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
249	1011	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
250	1011	CH3	GGCCAGCCAAGGAGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAATTACAAGACCACCTCCAGTGTGACAGCGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTTCAAGTATGATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC
251	4560	Completo	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYV PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
252	4560	Completo	

			GAACCTAAAAGCAGCGACAAGACCCACACATGCCCCCTTGTCCAGCTCCAGAAGTCTGGGAGGACC AAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCCAAGCCAAAGATACACTGATGATCAGCCGAAGTCCCAGGTCACCT GCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAA GTGCATAATGCAAAGACTAAACCACGGGAGGAACAGTACAACCTACATATAGAGTCGTGAGTGTCTCT GACTGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAAGTGTCTAATAAGGCCCTGC CTGCTCCAATCGAGAAAACCTATTAGTAAGGCAAAGGGCAGCCAGGGAACTCAGGTCTACGTGCTG CCTCCAAGTCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTCTCACTGCTGTGTCTGGTGAAGGATTCATATCC TTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTG TGCTGGACAGCGATGGGTCTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTGGACAAAAGCAGATGGCAGCAG GGAAACGCTCTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAG TCTGTACCTGGCAAA
253	4560	CH2	APELLGGPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
254	4560	CH2	GCTCCAGAAGTCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCCAAGCCAAAGATACACTGATGAT CAGCCGAAGTCCCAGGTCACCTGCGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCATAATGCAAAGACTAAACCACGGGAGGAACAGTACAACCT ACATATAGAGTCGTGAGTGTCTGACTGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTG CAAAGTGTCTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAGAAAACCTATTAGTAAGGCAAAA
255	4560	CH3	GQPREPQVYVLPISRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
256	4560	CH3	GGGAGCCAGGGAACCTCAGGTCTACGTGCTGCCTCCAAGTCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGT CTCACTGCTGTGTCTGGTGAAGGATTCATCCTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGCC AGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGGTCTTCTTTCTGTATTCA AAGCTGACAGTGGACAAAAGCAGATGGCAGCAGGAAACGTCCTTAGCTGTTCGGTGTGCACGAAGC CCTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTACCTGGC
257	3317	Completo	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGG TDFLTITISLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKEIKGGGSGGGSGGGSEVQLVSGGGLVQP GGSLRSLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLVWADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQ MNSLR AEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQTLVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
258	3317	Completo	

274	3317	H2	GTGAACCTAATAGCGGAGGCTCC
275	3317	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
276	3317	CH2	GCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCCAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCTAGAACCCTGAAGTGACATGTGTGGTCGTGGACGTCAGTCACGAGGACCCCGAAGTCAAATTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACCAAAACCCCGAGAGGAACAGTACAACCTCA ACCTATCGGGTCGTGAGCGTCTGACAGTGTGCATCAGGACTGGTGAACGGCAAGGAGTATAAGTG CAAAGTGAGCAACAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAGACCATTCCAAGGCTAAA
277	3317	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
278	3317	CH3	GGGAGCCCGCGAACCTCAGGTCTACGTGTATCCTCCAAGCCGAGATGAGCTGACAAAAACCAGGT CTCCCTGACTTGTCTGGTGAAGGGATTTTACCCAAGTGACATCGCAGTGGAGTGGGAATCAAATGGCC AGCCCGAAAAACAATTATAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCTGATGGGAGTTTCGACTGGTCTCC AACTGACCGTGGACAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAATCATACACACAGAAATCTCTGAGTCTGTACCTGGC
279	1015	Completo	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRADTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSK STSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT PEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK KAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTPPVLDSDGSF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
280	1015	Completo	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATCAACATCAAGGACACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCGATACATCCAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC CGCTGTGTACTATTGCAGTCGATGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCCGAGTGTGTTCCCTGGCTCCTCTAGTAAA TCCACCTCTGGAGGACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCTCCGAGCCTGTGACCGT GAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGC TGTAATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAGACCCA CACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTCTCTGTTTCCCCCTAAGC CAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGAGCTGTCTACGAG GACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAG AGAGGAACAGTACAACCTCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGACACAGGACTGGCTGA ACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAAGTAAAGGCCCTGCCTGTCCCAATCGAAAAACCATCTCT AAGGCCAAAGGCCAGCAAGGGAGCCCGAGGTGACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACACTGACCAA GAACAGGTGTCCCTGTGTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAAT CAATGAGCAGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCTCCAGTGTGACAGCAGATGGCAGCTTCTTC CTGTATTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTAGTGTGTCAGTGAT GCATGAAGCCCTGCACAATCATACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
281	1015	VH	

			EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS
282	1015	VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCCTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC CGCTGTGTACTATTCAGTTCGATGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAGCTCC
283	1015	H1	GFNIKDTY
284	1015	H1	GGATTCAACATCAAGGACACCTAC
285	1015	H3	SRWGGDGFYAMDY
286	1015	H3	AGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTAT
287	1015	H2	IYPTNGYT
288	1015	H2	ATCTATCCCCTAATGGATACACC
289	1015	CH1	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV
290	1015	CH1	GCCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGACAGC CGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGAGTTGGAATCAGGCGCCC TGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTG GTGACAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCATAAGCCCTCAAA TACAAAAGTGGACAAGAAAGTG
291	1015	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
292	1015	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCAGGTTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGAACAGTACAATCC ACTTATCGCGTGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
293	1015	CH3	GQPREPQVYVLPISRDELTKNQVSLTCLLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
294	1015	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGCTGTGTCTGGTAAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGCCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTGTTCAGTGATGCATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC
295	5244	Completo	

			DIQMTQSPSSLSASVGDVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFLTLISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDFYAMDYWGQGLVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFYF SDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
296	5244	Completo	GACATTGATGACACAGAGCCCCAGCTCCCTGAGTGCTTCAGTCGGCGACAGGGTACTATCACCTG CCGCGCATCCCAGGATGTCAACACCGCTGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAAGCCCCAAAGC TGCTGATCTACAGCGCTTCCCTCCTGATTTCTGGCGTGCCAAAGTCGGTTTTCTGGAAGTAGATCAGGC ACTGACTTCACACTGACTATCTCTAGTCTGCAGCCCGAAGATTTTGCCACCTACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCTACATTCGGACAGGGCACTAAAGTGGAGATTAAGGGCGGGTCCAGCGGAGGGA GCGGAGGAGGGTCCGAGGAGGGTCTGGAGGAGGGAGTGGAGAGGTCCAGCTGGTGGAACTCGGAGGA GGACTGGTGACGCTGGAGGCTCACTGCGACTGAGCTGTGCCGCTTCCGGCTTTAATACAAAAGACAC ATACATTCATTGGGTGAGGACAGGACCCAGGGAAGGGACTGGAATGGGTGGCCGCATCTATCCCACAA ATGGGTACTCGATATGCCACAGCGTGAAGGACGGTTTACCATTCTGCTGATACAGTAAGAAC ACAGCATACCTGCAGATGAACAGCCTGCCGCGCAGAGGATACAGCCGTGACTATTGCAGTCGATGGGG GGGAGACGGCTTACGCCATGGATTATTTGGGGCCAGGGGACTCTGGTCAACCGTCAAGCGCAGCCG AACCTAAATCCTCTGACAAGACCCACACATGCCACCCCTGTCTGCTCCAGAGTCTGGGAGGACCA TCCGTGTCTCTGTTTCCCTCAAAGCCTAAAGATACACTGATGATTAGCCGACTCCCGAAGTCACTG TGTGGTCTGGACGTGTCCACAGGACCCCGAAGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTCCGAGG TGCATAATGCCAAGACTAAACCAAGAGAGGAAACAGTACAATCAACCTATAGGGTCTGAGCGTCTCTG ACAGTCTGCATCAGGATGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGTGTCTAACAAAGCCCTGCC
			CGCTCCTATCGAGAAGACTATTAGCAAGGCAAAAAGGGCAGCCACGGGAACCCAGGTCTACGTGCTGC CCCTAGCAGAGACGAGCTGACCAAAAACAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGCTTTTATCCT AGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAATGGGCAGCCAGAAAACAATTACCTGACATGCCACCCGT GCTGGACAGCGATGGGTCTCTTTCTGTATTCCAACTGACTGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGG GAAACGCTTTCAGTGTCTCCGTGATGCACAGGGCCCTGCACAATCATTACACCAGAACTCTGAGT CTGTCACCCGGC
297	5244	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFLTLISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
298	5244	VL	GACATTGATGACACAGAGCCCCAGCTCCCTGAGTGCTTCAGTCGGCGACAGGGTACTATCACCTG CCGCGCATCCCAGGATGTCAACACCGCTGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAAGCCCCAAAGC TGCTGATCTACAGCGCTTCCCTCCTGATTTCTGGCGTGCCAAAGTCGGTTTTCTGGAAGTAGATCAGGC ACTGACTTCACACTGACTATCTCTAGTCTGCAGCCCGAAGATTTTGCCACCTACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCTACATTCGGACAGGGCACTAAAGTGGAGATTAAG
299	5244	L1	QDVNTA
300	5244	L1	CAGGATGTCAACACCGCT
301	5244	L3	QQHYTTPPT
302	5244	L3	CAGCAGCACTATAACCACACCCCTACA
303	5244	L2	SAS
304	5244	L2	AGCGCTTCC
305	5244	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDFYAMDYWGQGLVTVSS
306	5244	VH	

			GAGGTCAGCTGGTGGAAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGCTCACTGCGACTGAGCTGTGC CGCTTCCGGCTTTAACATCAAAGACACATACATTGTTGGTTCAGGCAGGCACCAGGGAAGGGACTGG AATGGGTGGCCCGCATCTATCCACAAATGGGTACACTCGATATGCCAGACAGCGTGAAAGGACGGTTT ACCATTTCTGCTGATACCAGTAAGAACACAGCATACTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCAGAGGATAC AGCCGTGTACTATTGCAGTCGATGGGGGGGAGACGGCTTCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGGA CTCTGGTCACCGTGTCAAGC
307	5244	H1	GFNIKDTY
308	5244	H1	GGCTTTAACATCAAAGACACATAC
309	5244	H3	SRWGGDGFYAMDY
310	5244	H3	AGTCGATGGGGGGGAGACGGCTTCTACGCCATGGATTAT
311	5244	H2	IYPTNGYT
312	5244	H2	ATCTATCCCACAAATGGGTACACT
313	5244	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
314	5244	CH2	GCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCCCTGCCAAAGCCTAAAGATACACTGATGAT TAGCCGCACCTCCGAAGTCACCTGTGTGGTTCGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCAAGAGAGGAACAGTACAATTCA ACCTATAGGGTTCGTGACGCTCCGACAGTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTG CAAAGTGTCTAAACAAGGCCCTGCCCGCTCCTATCGAGAAGACTATTAGCAAGGCAAAA
315	5244	CH3	GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
316	5244	CH3	GGGCAGCCACGGGAACCCAGGCTACGTGCTGCCCCCTAGCAGAGACGAGCTGACAAAAACCAGGT CTCCCTGCTGTCTGGTGAAGGGCTTTTATCCTAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGGC AGCCAGAAAACAATTACCTGACATGGCCACCCGTGCTGGACAGCGATGGGTCTTCTTCTGTATTCC AACTGACTGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGAAACGTCTTACAGTGTCCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTACCCGGC
317	-2	Completo	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSFIIPPSPDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
318	-2	Completo	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTGATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTCGATCGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCCAACCCTTTCCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCAT CTGTCTTCACTCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCTGCTG AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC CCAAGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
319	-2	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

320	-2	VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAAACAGGGGAAAGCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGCATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCACCCTTTTCGGCCAAGGGACAAAGTGGAGATCAAA
321	-2	L1	QDVNTA
322	-2	L1	CAGGACGTTAACACCGCT
323	-2	L3	QQHYTTPPT
324	-2	L3	CAACAGCATTAACTACCCACCCT
325	-2	L2	SAS
326	-2	L2	TCTGCATCC
327	-2	CL	RTVAAPSVFI PPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSL SSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
328	-2	CL	CGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC CTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACG CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAAGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCA TCAGGGCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
329	4372	Completo	EPKSSDKHTPCPPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
330	4372	Completo	GAACCTAAATCCAGCGACAAGACCCACACATGCCCCCTTGTCCAGCTCCAGAAGTGTGGGAGGACC AAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCAAGCCCAAAGATACACTGATGATCAGCCGAACTCCCGAGGTCACCT GCGTGGTTCGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGAAAGTCAAGTTCACACTGGTACGTGGACGGCGTCGAA GTGCATAATGCAAAGACTAAACCACGGGAGGAACAGTACAACCTCTACATATAGAGTCTGAGTGTCTCCT GACTGTGCTGCATCAGGATGGCTGAACGGCAAAGATATAAGTCAAAGTGTCTAATAAGGCCCTGC CTGCTCCAATCGAGAAAACCTATTAGTAAGGCAAAGGGCAGCCAGGGAACCTCAGTCTACGTGCTG CCTCCAAGTCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTCTCACTGCTGTGTCGTGGTAAAGGATTTCTATCC TTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCAGAGAACAATACCTGACCTGGCCCCCTG TGCTGGACAGCGATGGGTCTCTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTGGACAAAAGCAGATGGCAGCAG GGAAACGTCTTTAGCTGTCCCGTGTGCACGAAGCCCTGCACAATCATTACACCAGAAAGTCTCTGAG TCTGTACCTGGC
331	4372	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
332	4372	CH2	GCTCCAGAAGTGTGGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCAAGCCCAAAGATACACTGATGAT CAGCCGAACTCCCGAGGTCACCTGCGTGGTTCGTGGACGTGTCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTCAAGTGCATAATGCAAAGACTAAACCACGGGAGGAACAGTACAACCTCT ACATATAGAGTCTGAGTGTCTGACTGTGCTGCATCAGGATGGCTGAACGGCAAAGATATAAGTGT CAAAGTGTCTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAGAAAACCTATTAGTAAGGCAAAA
333	4372	CH3	GQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSEFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

334	4372	CH3	GGGCAGCCCAGGGAACCTCAGGTCTACGTGCTGCCTCCAAGTCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGT CTCACTGCTGTGTCTGGTAAAAGGATTCTATCCTTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGCC AGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGGTCTTCTTCTGTATTCA AAGCTGACAGTGGACAAAAGCAGATGGCAGCAGGGAAACGTCTTTAGCTGTCCGTGATGCACGAAGC CCTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTACCTGGC
-----	------	-----	--

<i>SEQ ID NO:</i>	<i>Pertuzumab WT CDR</i>	<i>sequenze</i>
335	CDR-H2	VNPNSGGS
336	CDR-H3	ARNLGPSFYFDY
337	CDR-H1	GFTFTDYT
338	CDR-L2	SAS
339	CDR-L3	QQYYIYPYT
340	CDR-L1	QDVSIG

<i>SEQ ID NO:</i>	<i>Trastuzumab WT CDR</i>	<i>sequenze</i>
341	CDR-H2	IYPTNGYT
342	CDR-H3	SRWGGDGFYAMDY
343	CDR-H1	GFNIKDTY
344	CDR-L2	SAS
345	CDR-L3	QQHYTPPT
346	CDR-L1	QDVNTA

Variante di Pertuzumab CDR-L3: QQYYIYPAT

Clone 3382, variante 10000 (SEQ ID NO: 347)

Variante CDR-H1 di Pertuzumab: GFTFADYT

Clone 6586, variante 10000 (SEQ ID NO:348)

RIVENDICAZIONI

1. Costrutto legante l'antigene comprendente

un primo costrutto polipeptidico legante l'antigene che si lega in modo monovalente e specificamente a un antigene di ECD2 (dominio extracellulare 2) di HER2 (recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano) su una cellula che esprime HER2 e un secondo costrutto polipeptidico legante l'antigene che si lega in modo monovalente e specificamente a un antigene ECD4 (dominio extracellulare 4) di HER2 su una cellula che esprime HER2, in cui:

i. il primo costrutto polipeptidico legante l'antigene è un Fab e comprende un primo polipeptide variabile di catena pesante VH1 comprendente il VH del costrutto polipeptidico legante ECD2 di SEQ ID NO:221 (v7091) e un primo polipeptide di catena leggera variabile VL1 comprendente il VL del costrutto polipeptidico legante ECD2 di SEQ ID NO:35 (v7091), e il secondo costrutto polipeptidico legante l'antigene è un scFv e comprende un secondo polipeptide variabile di catena pesante VH2 comprendente il VH del costrutto polipeptidico legante ECD4 di SEQ ID NO: 305 (v7091) e un secondo polipeptide variabile di catena leggera VL2 comprendente il VL del costrutto polipeptidico legante ECD4 di SEQ ID NO:297 (v7091); o

ii. il primo costrutto polipeptidico legante l'antigene è un Fab e comprende un primo polipeptide variabile di catena pesante VH1 comprendente il VH del costrutto polipeptidico legante ECD2 di SEQ ID NO:99 (v10000) e un primo polipeptide variabile di catena leggera VL1 comprendente il VL del costrutto polipeptidico legante ECD2 di SEQ ID NO:71 (v10000), e il secondo costrutto polipeptidico legante l'antigene è un scFv e comprende un secondo polipeptide variabile di catena pesante VH2 comprendente il VH del costrutto polipeptidico legante ECD4 di SEQ ID NO: 305 (v10000) e un secondo polipeptide variabile di catena leggera VL2 comprendente il VL del costrutto polipeptidico legante ECD4 di SEQ ID NO:297 (v10000); e

un primo e un secondo polipeptide linker, in cui il primo e il secondo polipeptide linker comprendono ciascuno un polipeptide della regione cerniera dell'immunoglobulina selezionato tra una regione cerniera delle IgG1, IgG2 o IgG4, in cui il primo polipeptide linker è collegato operativamente al primo costrutto polipeptidico legante l'antigene e il secondo polipeptide linker è collegato operativamente al secondo costrutto polipeptidico legante l'antigene,

in cui i polipeptidi linker sono collegati in modo covalente tra loro,

e in cui i polipeptidi linker sono collegati operativamente a una regione di Fc eterodimerico;

in cui il costrutto legante l'antigene ha la capacità di mediare L'ADCC.

2. Costrutto legante l'antigene secondo la rivendicazione 1, comprendente un polipeptide di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:33 e un polipeptide di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:219 e un terzo polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:295.
3. Costrutto legante l'antigene secondo la rivendicazione 1, comprendente un polipeptide di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:69 e un polipeptide di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:97 e un terzo polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:295.
4. Costrutto legante l'antigene secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui il primo costrutto polipeptidico legante l'antigene blocca il legame di pertuzumab a ECD2 del 50% o più in un saggio di legame competitivo, e/o il secondo polipeptide legante l'antigene blocca il legame di trastuzumab a ECD4 del 50% o più in un saggio di legame competitivo.
5. Costrutto legante l'antigene secondo la rivendicazione 1, in cui (i) il primo costrutto polipeptidico legante l'antigene comprende una sequenza amminoacidica almeno al 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identica ad (a) il primo costrutto polipeptidico legante l'antigene (v10000) comprendente SEQ ID NO:97 (catena pesante) e SEQ ID NO:69 (catena leggera) o (b) il primo costrutto polipeptidico legante l'antigene (v7091) comprendente SEQ ID NO: 219 (catena pesante) e SEQ ID NO: 33 (catena leggera), e (ii) il secondo costrutto polipeptidico legante l'antigene comprende una sequenza amminoacidica almeno al 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identica a SEQ ID NO:295 (catena pesante).
6. Costrutto legante l'antigene secondo una qualsiasi rivendicazione precedente, in cui l'Fc eterodimerico comprende una o più modifiche in almeno una delle sequenze CH3, facoltativamente in cui l'Fc eterodimerico comprende una o più modifiche in almeno una delle sequenze CH3 che favoriscono la formazione di un eterodimero con stabilità paragonabile a un Fc omodimerico wild-type.
7. Costrutto legante l'antigene secondo una qualsiasi rivendicazione precedente, comprendente
 - i. un Fc di IgG1 eterodimerico comprendente le modifiche T350V_L351Y_F405A_Y407V nel primo polipeptide Fc e le modifiche T366I_N390R_K392M_T394W nel secondo polipeptide Fc;
 - ii. un Fc di IgG1 eterodimerico comprendente le modifiche L351Y_S400E_F405A_Y407V nel primo polipeptide Fc e le modifiche T350V_T366L_K392L_T394W nel secondo polipeptide Fc;
 - iii. un Fc di IgG1 eterodimerico avente le modifiche L351Y_F405A_Y407V nel primo polipeptide Fc e le modifiche T366L_K392M_T394W nel secondo polipeptide;
 - iv. un Fc di IgG1 eterodimerico comprendente le modifiche L351Y_F405A_Y407V nel primo polipeptide Fc e le modifiche

T366L_K392L_T394W nel secondo polipeptide Fc;

v. un Fc di IgG1 eterodimerico comprendente le modifiche T350V_L351Y_F405A_Y407V nel primo polipeptide Fc e le modifiche T350V_T366L_K392L_T394W nel secondo polipeptide Fc;

vi. un Fc di IgG1 eterodimerico comprendente le modifiche T350V_L351Y_F405A_Y407V nel primo polipeptide Fc e le modifiche T350V_T366L_K392M_T394W nel secondo polipeptide Fc; o

vii. un Fc di IgG1 eterodimerico comprendente le modifiche T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V nel primo polipeptide Fc e le modifiche T350V_T366L_N390R_K392M_T394W nel secondo polipeptide Fc,

secondo la numerazione EU rispetto a un Fc omodimerico wild-type.

8. Costrutto legante l'antigene secondo una qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il dominio CH2 di Fc eterodimerico comprende una o più modifiche.

9. Costrutto legante l'antigene secondo una qualsiasi rivendicazione precedente, in cui:

a) l'Fc eterodimerico comprende una o più modifiche per favorire il legame selettivo dei recettori Fc gamma, e/o

b) il costrutto è glicosilato, facoltativamente in cui il costrutto è afucosilato e/o

c) il costrutto è coniugato a un farmaco, e facoltativamente in cui il farmaco è maitansina (DM1), o in cui il costrutto è coniugato a DM1 con un linker SMCC.

10. Composizione farmaceutica comprendente il costrutto legante l'antigene secondo una qualsiasi rivendicazione precedente e un carrier farmaceutico, facoltativamente in cui il carrier farmaceutico comprende un tampone, un antiossidante, una molecola a basso peso molecolare, un farmaco, una proteina, un amminoacido, un carboidrato, un lipide, un agente chelante, uno stabilizzatore o un eccipiente.

11. Composizione farmaceutica per l'uso in medicina comprendente il costrutto legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9.

12. Costrutto legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9 o composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 11 per l'uso in un metodo di trattamento del cancro, in cui il cancro è un tumore che esprime HER2 (HER2+) in un soggetto.

13. Costrutto legante l'antigene per l'uso o composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 12, in cui il tumore è cancro pancreatico, cancro della testa e del collo, cancro polmonare, cancro gastrico, cancro coloretale, cancro mammario, cancro renale, cancro cervicale, cancro ovarico, cancro endometriale, cancro uterino, melanoma maligno, cancro della faringe, cancro della vescica, cancro orale o cancro

della pelle, facoltativamente in cui il tumore comprende cellule che esprimono una media di 10.000 o più copie di HER2 per cellula tumorale.

14. Costrutto legante l'antigene per l'uso o composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 12 o la rivendicazione 13, in cui il tumore è HER2 1+, HER2 2+ o HER2 3+ come determinato mediante immunistochemica (IHC), facoltativamente in cui il tumore esprime HER2 a un livello di 2+ o inferiore come determinato mediante IHC.

15. Costrutto legante l'antigene per l'uso o composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12-14,

- a) in cui il soggetto non è stato precedentemente trattato con un anticorpo anti-HER2, o
- b) in cui il tumore è resistente o refrattario a pertuzumab, trastuzumab e/o TDM1, o
- c) in cui il soggetto è stato precedentemente trattato con pertuzumab, trastuzumab e/o TDM1.

16. Costrutto legante l'antigene per l'uso o composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12-15, in cui la somministrazione è effettuata mediante iniezione o infusione.

17. Costrutto legante l'antigene per l'uso o composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12-16, comprendente inoltre somministrare al soggetto un agente aggiuntivo, facoltativamente un agente chemioterapico, e facoltativamente in cui

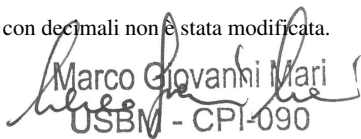
- i. il tumore è un cancro del polmone non a piccole cellule e l'agente aggiuntivo è uno o più tra cisplatino, carboplatino, paclitaxel, paclitaxel legato ad albumina, docetaxel, gemcitabina, vinorelbina, irinotecan, etoposide, vinblastina o pemetrexed;
- ii. il tumore è un cancro gastrico o dello stomaco e l'agente aggiuntivo è uno o più tra 5-fluorouracile (con o senza acido folinico), capecitabina, carboplatino, cisplatino, docetaxel, epirubicina, irinotecan, oxaliplatino o paclitaxel;
- iii. il tumore è un cancro pancreatico e l'agente aggiuntivo è uno o più tra gemcitabina, folfirinnox, abraxane o 5-fluorouracile;
- iv. il tumore è un cancro mammario positivo agli estrogeni e/o al progesterone e l'agente aggiuntivo è uno o più tra una combinazione di (a) doxorubicina ed epirubicina, (b) una combinazione di paclitaxel e docetaxel o (c) una combinazione di fluorouracile, ciclofosfamide e carboplatino;
- v. il tumore è un cancro della testa e del collo e l'agente aggiuntivo è uno o più tra paclitaxel, carboplatino, doxorubicina o cisplatino; o

- vi. il tumore è un cancro ovarico e l'agente aggiuntivo è uno o più tra cisplatino, carboplatino o un taxano come paclitaxel o docetaxel.
18. Costrutto legante l'antigene per l'uso o composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 12, in cui:
il tumore comprende una cellula di carcinoma duttale mammario umano HER2 1+ ER+ (positivo al recettore degli estrogeni), una cellula di carcinoma mammario HER2 2+/3+ umano ER+ amplificato con HER2 o una cellula di carcinoma mammario umano HER2 0+/1+ triplo negativo; o
il costrutto legante l'antigene è coniugato a maitansina (DM1) e il tumore comprende una cellula di carcinoma duttale mammario umano HER2 0+ (basale B, triplo negativo di tipo mesenchimale), una cellula di carcinoma mammario HER2 2+ ER+ o una cellula di carcinoma mammario metastatico umano HER2 0+ (ER-, amplificato con HER2, luminale A, TN).
19. Metodo di rilevamento o misurazione di HER2 in un campione comprendente far entrare a contatto il campione con il costrutto legante l'antigene secondo le rivendicazioni 1-9 e rilevare o misurare il complesso legato.
20. Metodo *in vitro* di uccisione o inibizione della crescita di una cellula tumorale che esprime HER2 comprendente far entrare a contatto la cellula con il costrutto legante l'antigene secondo le rivendicazioni 1-9.
21. Metodo secondo la rivendicazione 20, in cui la cellula tumorale è una cellula selezionata tra le linee cellulari tumorali pancreatiche BxPC3, Capan-1, MiaPaca2; linee cellulari tumorali polmonari Calu-3, NCI-H322; linee cellulari tumorali della testa e del collo Detroit 562, SCC-25, FaDu; linee cellulari tumorali coloretali HT29, SNU-C2B; linea cellulare tumorale gastrica NCI-N87; linee cellulari tumorali mammarie MCF-7, MDAMB175, MDAMB361, MDA-MB-231, BT-20, JIMT-1, SkBr3, BT-474; linea cellulare tumorale uterina TOV-112D; linea cellulare tumorale cutanea Malme-3M; linee cellulari tumorali cervicali Caski, MS751; linea cellulare tumorale della vescica T24, linee cellulari tumorali ovariche CaOV3 e SKOV3.
22. Metodo secondo la rivendicazione 20, in cui la cellula tumorale è selezionata tra una cellula di cancro ovarico HER2 2/3+ con gene amplificato, una cellula di cancro mammario HER2 0+/1+ triplo negativo; una cellula di cancro mammario HER2 1+, ER+; una cellula di cancro mammario HER2 2+ resistente a trastuzumab; una cellula di cancro mammario HER2+, ER+; o una cellula di cancro mammario HER2 3+.
23. Metodo di produzione di costrutti secondo le rivendicazioni 1-9, comprendente coltivare una cellula ospite in condizioni idonee per esprimere il costrutto legante l'antigene, in cui la cellula ospite comprende un polinucleotide che codifica il costrutto legante l'antigene secondo le rivendicazioni 1-9, e purificare il costrutto.

24. Polinucleotide isolato o insieme di polinucleotidi isolati che codifica un costrutto legante l'antigene secondo le rivendicazioni 1-9, facoltativamente in cui il polinucleotide o l'insieme di polinucleotidi è cDNA.
25. Polinucleotide isolato o insieme di polinucleotidi isolati secondo la rivendicazione 24, che codifica (i) SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 33 e SEQ ID NO: 295 o (ii) SEQ ID NO:97, SEQ ID NO: 69 e SEQ ID NO:295.
26. Vettore o insieme di vettori comprendente il polinucleotide o l'insieme di polinucleotidi secondo la rivendicazione 24 o 25, facoltativamente selezionato dal gruppo costituito da un plasmide, un vettore virale, un vettore di mammifero non episomiale, un vettore di espressione e un vettore di espressione ricombinante.
27. Cellula isolata comprendente un polinucleotide o un insieme di polinucleotidi secondo la rivendicazione 24 o 25 o un vettore o un insieme di vettori secondo la rivendicazione 26, facoltativamente in cui la cellula isolata è un ibridoma, una cellula di ovaio di criceto cinese (CHO) o una cellula HEK293.
28. Kit comprendente il costrutto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9 e istruzioni per l'uso.
29. Costrutto per l'uso o composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 12, in cui il tumore HER2+ è (i) un cancro mammario duttale invasivo HER2 3+ negativo al recettore degli estrogeni (ER-), negativo al recettore del progesterone (PR-), resistente a trastuzumab, resistente alla chemioterapia, (ii) un cancro mammario infiammatorio HER2 3+ ER-, PR-, resistente a trastuzumab, (iii) un carcinoma duttale invasivo HER2 3+, ER-, PR- o (iv) un cancro mammario HER2 2+ con gene HER2 amplificato resistente a trastuzumab e pertuzumab.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede. Si nota che, nelle tabelle presenti nella traduzione, la notazione anglosassone dei numeri con decimali non è stata modificata.


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

LEGENDA DELLE TAVOLE DI DISEGNO

TAVOLA 2/67

FIGURA 2

"Pool Protein" = Proteina in gruppi

"SEC fraction" = Frazione SEC

"Pool SEC (fractions 16 - 18 inc)" = SEC in gruppi (frazioni 16 - 18 incl)

"4-12%SDS-PAGE no DTT SEC final pool (MOPS)" = 4-12%SDS-PAGE senza DTT SEC gruppo finale (MOPS)

TAVOLA 3/67

FIGURA 2 (Continua)

"Cont'd" = Cont.

TAVOLA 4/67

FIGURA 3A

"injection overlay" = sovrapposizione di iniezione

"Minutes" = Minuti

"peak" = picco

"est MW" = MW est

"Ret time" = Tempo di rit.

"% peak area" = % area di picco

TAVOLA 5/67

FIGURA 3B

"PROTEIN" = PROTEINA

"V10000-711-A IN A58U BUFFER" = V10000-711-A IN TAMPONE A58U

"A58U BUFFER" = TAMPONE A58U

"Peak" = Picco

"Type" = Tipo

"Height" = Altezza

TAVOLE 6-7/67

FIGURE 4A-4B

"Mass Spectrum" = Spettro di massa

"Sample" = Campione

"Desired heterodimer species" = Specie di eterodimero desiderata

"Higher-mass homodimer species" = Specie di omodimero di massa superiore

"Lower-mass homodimer species" = Specie di omodimero di massa inferiore

"Higher-mass half-antibody species" = Specie di mezzo-anticorpo di massa superiore

"Lower-mass half-antibody species" = Specie di mezzo-anticorpo di massa inferiore

"Other species" = Altre specie

TAVOLA 9/67

FIGURA 5B

"Cal. MW for heterodimer" = MW. cal. per eterodimero

"Cal. MW for CL720 homodimer" = MW. cal. per omodimero CL720

"Cal. MW for CL3057+CL811 homodimer" = Mw. cal. per omodimero CL3057+CL811

"Amount of Each Specie sas a Percentage of All Quantified" = Quantità di ciascuna specie come percentuale di tutte quelle quantificate

"Heterodimer" = Eterodimero

"CH-A Homodimer" = Omodimero CH-A

"CH-B Homodimer" = Omodimero CH-B

"CH-B Monomer" = Monomero CH-B

"CH-A Half-antibody" = Mezzo-anticorpo CH-A

"Lysine and O-glycan side peaks were not included in this calculation" = I picchi laterali di lisina e O-glicano non sono stati inclusi in questo calcolo

TAVOLE 10-13/67

FIGURE 6, 6 (Continua)

"Concentration" = Concentrazione

"Cont'd" = Cont.

TAVOLA 14/67

FIGURA 7

"% growth relative to hlgG" = % di crescita rispetto a hlgG

"Cell count (5 day)" = Conta cellulare (5 giorni)

TAVOLA 15, 65-66/67

FIGURA 7(Continua), 46-46(continua)

"% Surviving fractions (5 days)" = % di frazioni sopravvissute (5 giorni)

"Cont'd" = Cont.

TAVOLA 17/67

FIGURA 9

"Surface 37°C 24h" = Superficie 37 °C 24 ore

"Internal 37°C 24h" = Interno 37 °C 24 ore

TAVOLE 18-19/67

FIGURE 10-10 (continua)

"Surface 4°C 2h" = Superficie 4 °C 2 ore

"Surface 37°C 24h" = Superficie 37 °C 24 ore

"Surface 4 deg" = Superficie 4 gradi

"Surface 37 deg" = Superficie 37 gradi

"Internal 37°C 24h" = Interno 37 °C 24 ore

"Cont'd" = Cont.

TAVOLA 20/67

FIGURA 11

"% Target cell lysis" = % di lisi di cellule target

"Concentration" = Concentrazione

TAVOLA 21/67

FIGURA 12

"Concentration of injected variants" = Concentrazione di varianti iniettate

TAVOLA 22/67

FIGURA 13

"RU v5019 captured" = RU v5019 catturate

"RU v4182 captured" = RU v4182 catturate

"RU v630 captured" = RU v630 catturate

TAVOLA 24/67

FIGURA 15

"p-Akt/Akt Ratio (Fold Change CTL)" = Rapporto p-Akt/Akt (Fold Change CTL)

"p-Akt/Akt Change (Fold Change vs. CTL)" = Variazione p-Akt/Akt (Fold Change vs CTL)

"Variant" = Variante

TAVOLA 25/67

FIGURA 16

"% effect relative to control" = % di effetto rispetto al controllo

TAVOLE 26-28/67

FIGURE 17-17(continua)

"% Surviving fractions (5 days)" = % di frazioni sopravvissute (5 giorni)

"Log Concentration" = Concentrazione log

"Cont'd" = Cont.

TAVOLE 29, 31, 33-37/67

FIGURE 18A, 19A, 20-24

"Mean tumour volume" = Volume medio del tumore

"Study day (post dose)" = Giorno di studio (post dose)

TAVOLE 30, 32/67

FIGURE 18B, 19B

"Percent survival" = Sopravvivenza in percentuale

"Study day (post dose)" = Giorno di studio (post dose)

"log rank test" = test dei ranghi logaritmici

TAVOLE 38-39/67

FIGURE 25-26

"Chain B scFv" = Catena B scFv

"Fc and Chain A Fab" = Fc e catena A Fab

"Temperature" = Temperatura

"Chain A Fab" = Catena A Fab

TAVOLA 40/27

FIGURA 27

"% Target Cell Lysis" = % di lisi di cellule target

"Ab Concentration" = Concentrazione di Ab

TAVOLA 41/67

FIGURA 27(continua)

"% Target Cell Lysis" = % di lisi di cellule target

"Ab Concentration" = Concentrazione di Ab

"Concentration" = Concentrazione

"Cont'd" = Cont.

TAVOLE 42-43/67

FIGURE 28-28C

"% Target Cell Lysis" = % di lisi di cellule target

"Concentration" = Concentrazione

TAVOLA 44/67

FIGURA 29

"% Surviving Fraction Relative to Control Mock" = % di frazione sopravvissuta rispetto al controllo mock

TAVOLA 45/67

FIGURA 30

"mean tumour volume" = volume medio del tumore

"Study day (post Dose)" = Giorno di studio (post Dose)

"Vehicle" = Veicolo

"p<0.05 vs Vehicle" = p<0,05 vs veicolo

TAVOLA 46/67

FIGURA 31

"Concentration" = Concentrazione

TAVOLA 47/67

FIGURA 31(continua)

"Log Concentration" = Concentrazione log

"Cont'd" = Cont.

TAVOLA 48/67

FIGURA 32

"mean tumour volume" = volume medio del tumore

"Study day (post Dose)" = Giorno di studio (post Dose)

"IgG Control" = Controllo con IgG

"Non-parametric Kruskal-Wallis" = Kruskal-Wallis non parametrico

"Non-parametric Mann-Whitney (T-test)" = Mann-Whitney non parametrico (T-test)

"Percent survival" = Sopravvivenza in percentuale

"log rank" = ranghi logaritmici

TAVOLA 49/67

FIGURA 33

"mean tumour volume" = volume medio del tumore

"Study day (post Dose)" = Giorno di studio (post Dose)

"IgG Control" = Controllo con IgG

"Non-parametric Kruskal-Wallis" = Kruskal-Wallis non parametrico

"Percent survival" = Sopravvivenza in percentuale

"log rank" = ranghi logaritmici

"p<0.05 vs Herceptin + Docetaxel" = p<0,05 vs Herceptin + Docetaxel

TAVOLA 50/67

FIGURA 34

"mean tumour volume" = volume medio del tumore

"Study day (post Dose)" = Giorno di studio (post Dose)

"Non-parametric Mann-Whitney" = Mann-Whitney non parametrico

TAVOLA 51/67

FIGURA 35

"mean tumour volume" = volume medio del tumore

"Study day (post Dose)" = Giorno di studio (post Dose)

"non-specific IgG" = IgG non specifica

"Percent survival" = Sopravvivenza in percentuale

"log rank" = ranghi logaritmici

TAVOLA 52/67

FIGURA 36

"mean tumour volume" = volume medio del tumore

"Study day (post Dose)" = Giorno di studio (post Dose)

"non-specific IgG" = IgG non specifica

TAVOLA 53/67

FIGURA 37

"% Growth Inhibition" = % di inibizione della crescita

"Pancreatic" = Pancreatico

"Lung" = Polmonare

"Head&Neck" = Testa & Collo

"Gastric" = Gastrico

"Colorectal" = Coloretale

"Renal" = Renale

"Breast" = Mammario

"Cervical" = Cervicale

"Ovarian" = Ovarico

"Skin" = Pelle

"Endomet" = Endometrio

"H&N" = Testa & Collo

"Bladder" = Vescica

TAVOLA 54/67

FIGURA 38

"Cell Line" = Linea cellulare

"Cell Line Description" = Descrizione della linea cellulare

"IHC Receptor" = Recettore IHC

"Ref" = Rif

"activity" = attività

"human pancreas adenocarcinoma" = adenocarcinoma pancreatico umano

"human pancreas carcinoma" = carcinoma pancreatico umano

"human pancreas adenocarcinoma, metastatic" = adenocarcinoma pancreatico umano, metastatico

"human lung carcinoma" = carcinoma polmonare umano

"human lung adenocarcinoma" = adenocarcinoma polmonare umano

"human lung anaplastic carcinoma" = carcinoma anaplastico polmonare umano

"human adenocarcinoma; non-small cell lung cancer" = adenocarcinoma umano; carcinoma polmonare non a piccole cellule

"human Caucasian bronchioalveolar carcinoma" = carcinoma bronchioalveolare caucasico umano

"human pharyngeal carcinoma" = carcinoma faringeo umano

"human tongue squamous cell carcinoma" = carcinoma a cellule squamose della lingua umano

"squamous cell carcinoma, pharynx" = carcinoma a cellule squamose, faringe

"human colorectal adenocarcinoma" = adenocarcinoma coloretale umano

"human colorectal adenocarcinoma, Dukes' type C" = adenocarcinoma coloretale umano, tipo C di Dukes

"human colorectal carcinoma" = carcinoma coloretale umano

"humancecum colorectal carcinoma" = carcinoma coloretale del cieco umano

"human gastric carcinoma" = carcinoma gastrico umano

"human breast ductal carcinoma, ER+" = carcinoma duttale mammario umano, ER+

"human breast adenocarcinoma, ER+, HER2 amp" = adenocarcinoma mammario umano, ER+, HER2 amp

"human breast duct epithelial ductal carcinoma, ER+ luminal A" = carcinoma duttale dell'epitelio del dotto mammario umano, ER+ luminale A

"human breast carcinoma, Basal A TNBC" = carcinoma mammario umano, TNBC basale A

"human breast ductal carcinoma, Basal B, Mesenchymal-like TNBC, ER-" = carcinoma duttale mammario umano, basale B, TNBC di tipo mesenchimale, ER-

"human breast adenocarcinoma, ER+" = adenocarcinoma mammario umano, ER+

"human breast metastatic carcinoma, ER-, HER2amp luminal A TNBC" = carcinoma mammario metastatico umano, ER-, HER2amp luminale A
TNBC

"human uterus mesodermal tumor (mixed) grade III" = tumore mesodermico dell'utero umano (misto) grado III

"human primary malignant adenocarcinoma; endometrioid carcinoma" = adenocarcinoma maligno primario umano; carcinoma endometriode

"human skin epidermoid carcinoma" = carcinoma epidermoide della pelle umana

"human malignant melanoma, metastatic lung" = melanoma maligno umano, metastatico del polmone

"human malignant melanoma" = melanoma maligno umano

"human cervix carcinoma" = carcinoma della cervice umana

"human cervix epidermoid carcinoma" = carcinoma epidermoide della cervice umana

"human urinary bladder carcinoma" = carcinoma della vescica urinaria umana

"human renal cell adenocarcinoma" = adenocarcinoma a cellule renali umane

"human ovary adenocarcinoma" = adenocarcinoma dell'ovaio umano

TAVOLE 55-57/67

FIGURE 39-40

"% Target Cell Lysis" = % di lisi di cellule target

"Concentration" = Concentrazione

TAVOLE 58-59

FIGURE 41-41(continua)

"Concentration" = Concentrazione

"Cont'd" = Cont.

TAVOLA 60/67

FIGURA 42

"Surface 4°C" = Superficie 4 °C

"Surface 37°C" = Superficie 37 °C

"Internal 37°C" = Interno 37 °C

TAVOLE 61-62

FIGURE 43-43C

"% Target Cell Lysis" = % di lisi di cellule target

"Concentration" = Concentrazione

TAVOLA 63/67

FIGURA 44

"% Surviving Fraction Relative to Control Mock" = % di frazione sopravvissuta rispetto al controllo mock

"Control" = Controllo

TAVOLA 64/67

FIGURA 45

"% Surviving fractions (5 days)" = % di frazioni sopravvissute (5 giorni)

"Log Concentration" = Concentrazione log

TAVOLA 65/67

FIGURA 46

"% Surviving fractions (5 days)" = % di frazioni sopravvissute (5 giorni)

TAVOLA 66/67

FIGURA 46 (continua)

"% Surviving fractions (5 days)" = % di frazioni sopravvissute (5 giorni)

"Cont'd" = Cont.

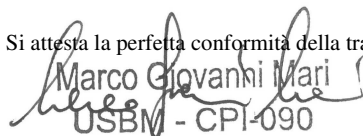
TAVOLA 67/67

FIGURA 47

"Avg RU capture corrected for MW" = Cattura di RU in media corretta per MW

* * * * *

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

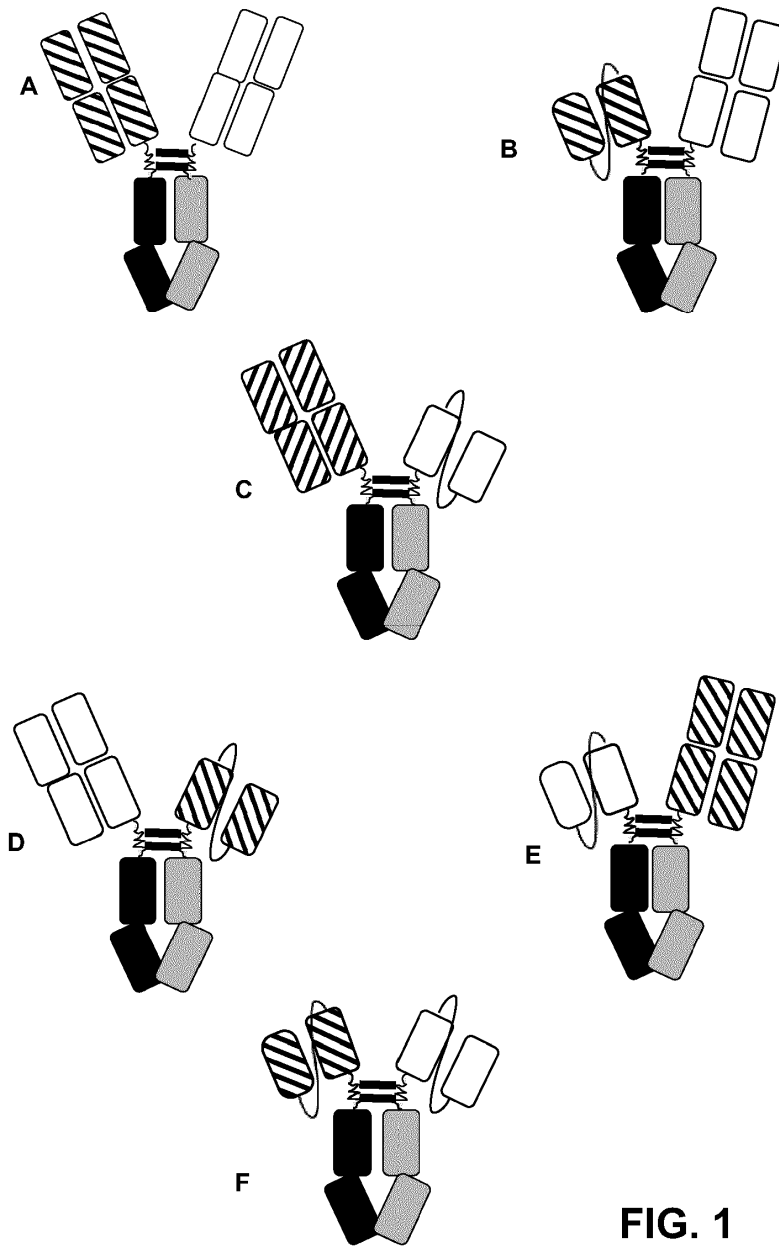


FIG. 1

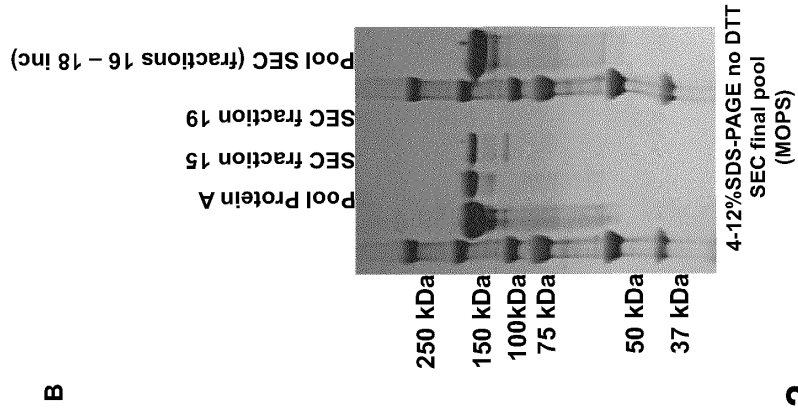


FIG. 2

Marco Giovanni Mari
USBM 6PT-090

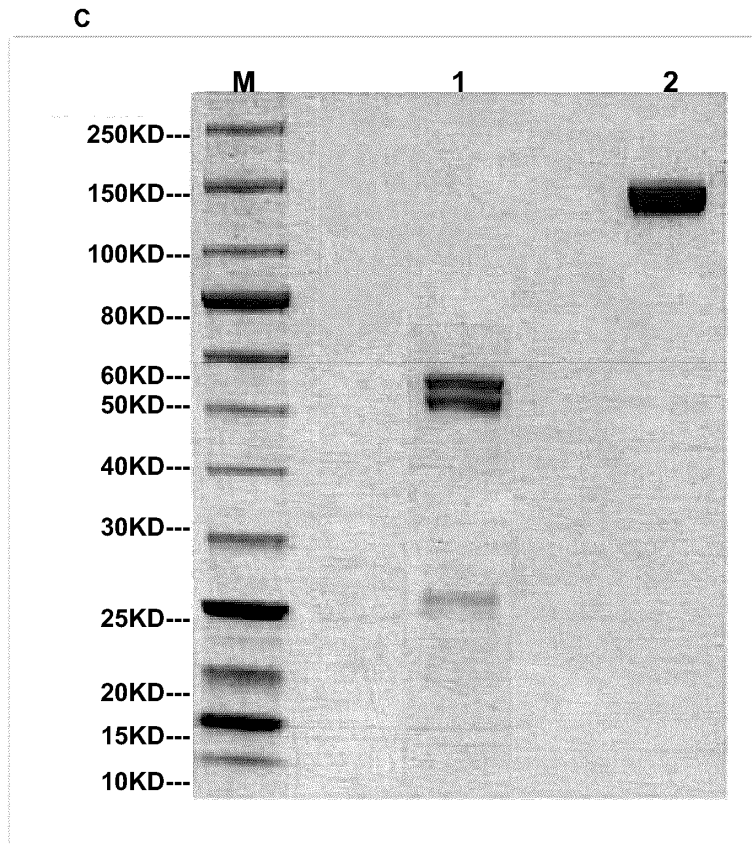


FIG. 2 (Cont'd...)

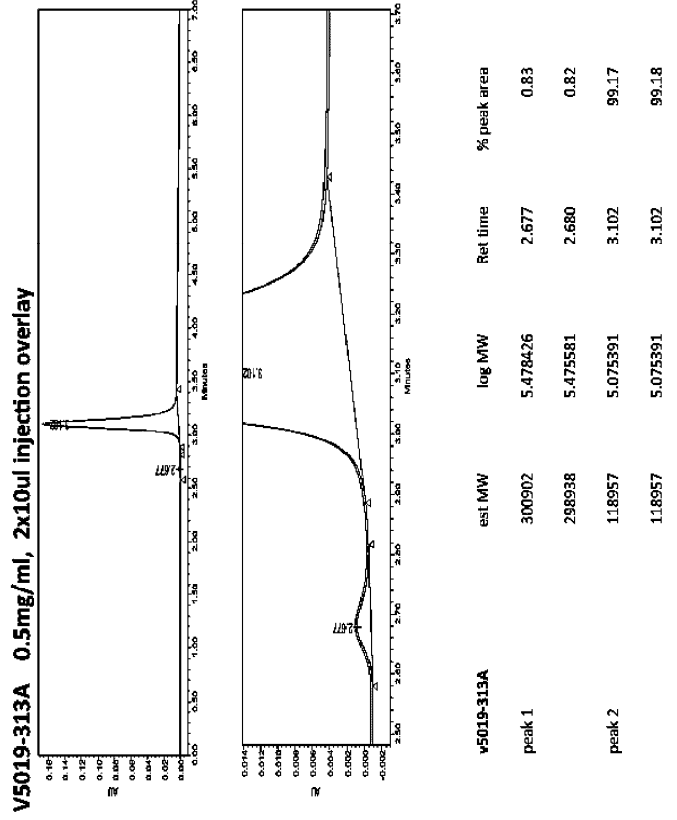
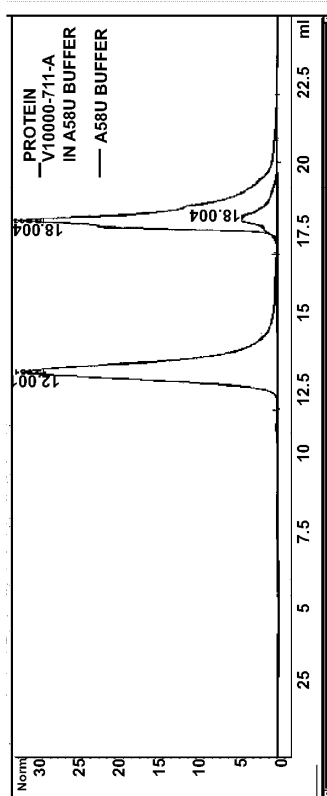


FIG. 3A

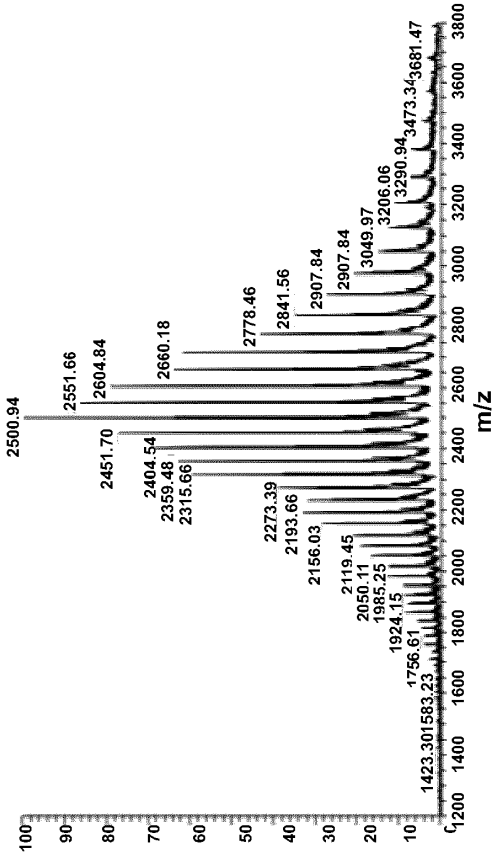


Peak #	RT (min)	Type	Height	Area	Area%
1	8.022	MFR	0.183	22.103	1.508
2	11.059	MFR	0.179	9.708	0.662
3	12.961	MFR	30.701	1416.498	96.619
4	15.419	FMR	0.299	17.759	1.211

FIG. 3B

**5019-313-A
Mass Spectrum**

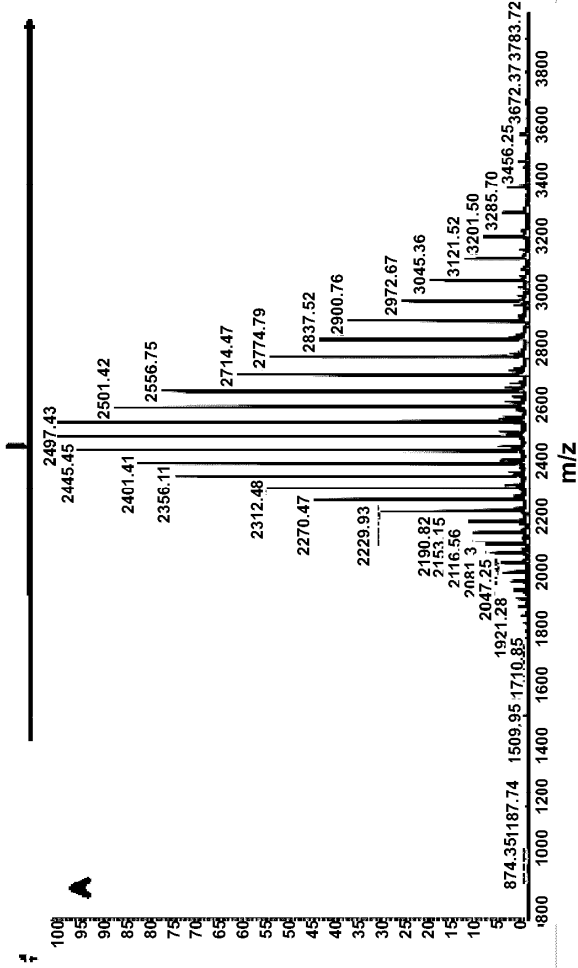
A



Sample	Desired heterodimer species	Higher-mass homodimer species	Lower-mass homodimer species	Higher-mass half-antibody species	Lower-mass half-antibody species	Other species
5019-313-A	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

FIG. 4A

10000-719-A Mass Spectrum



Sample	Desired heterodimer species	Higher-mass homodimer species	Lower-mass homodimer species	Higher-mass half-antibody species	Lower-mass half-antibody species	Other species
10000-719-A	97.9	1.0	0.7	0.3	0.0	0.0

FIG. 4B

Marco Giovanni Mari
USBM 6PT-090

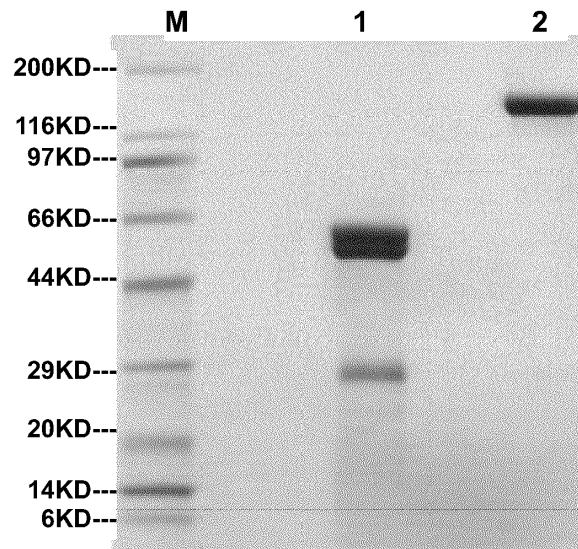
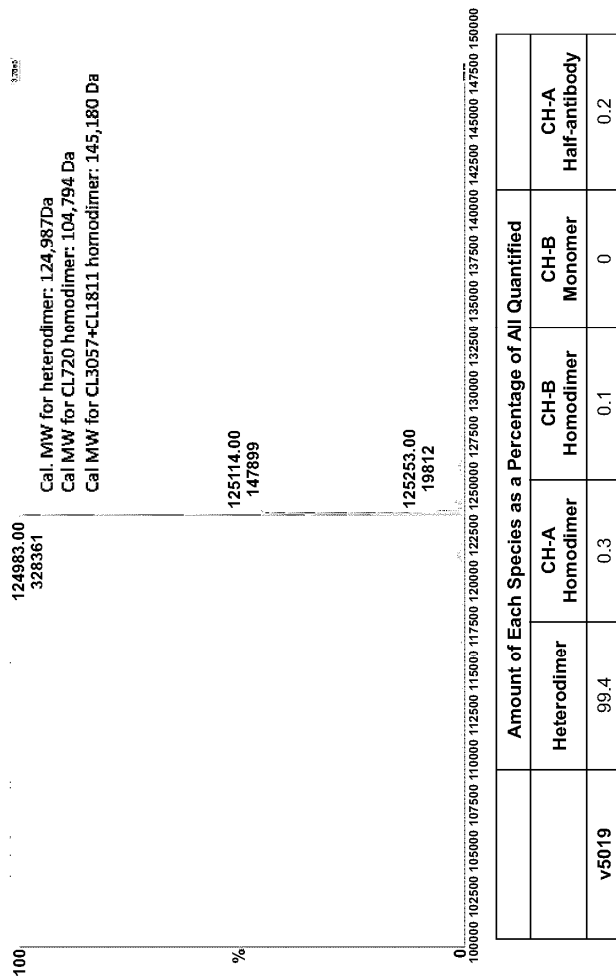


FIG. 5A



*: Lysine and O-glycan side peaks were not included in this calculation

FIG. 5B

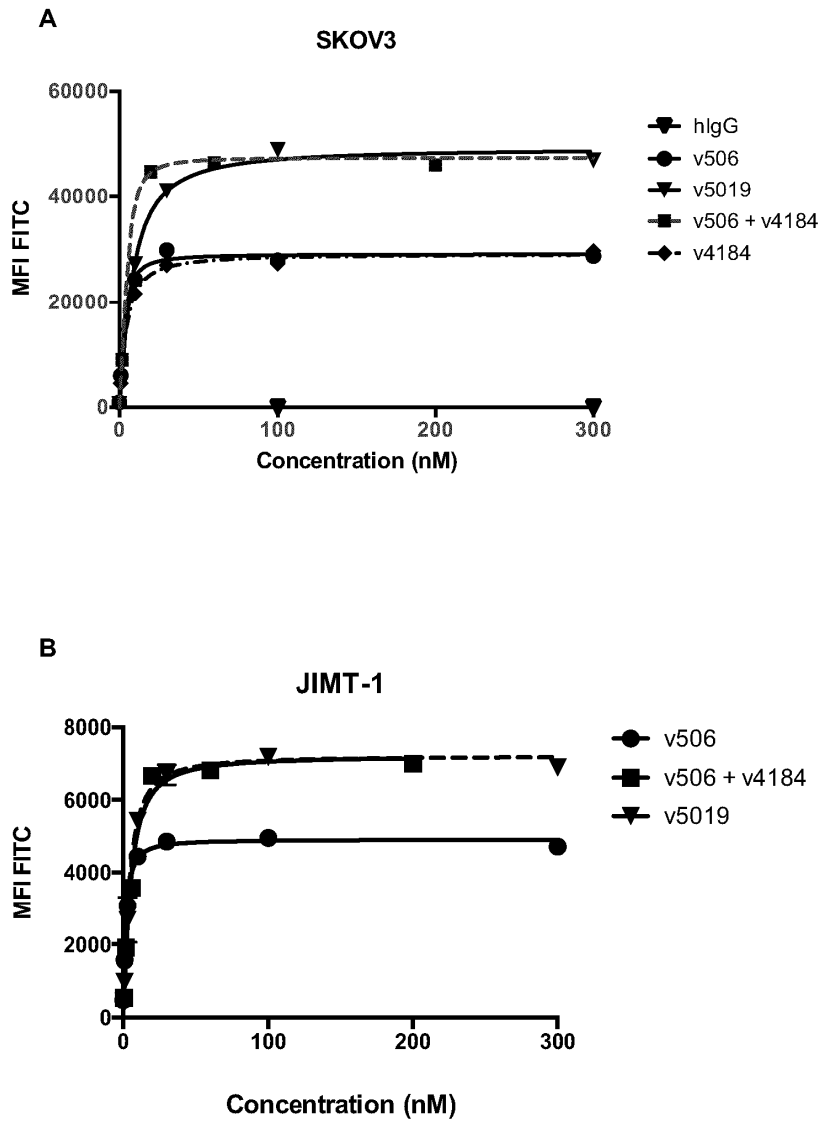


FIG. 6

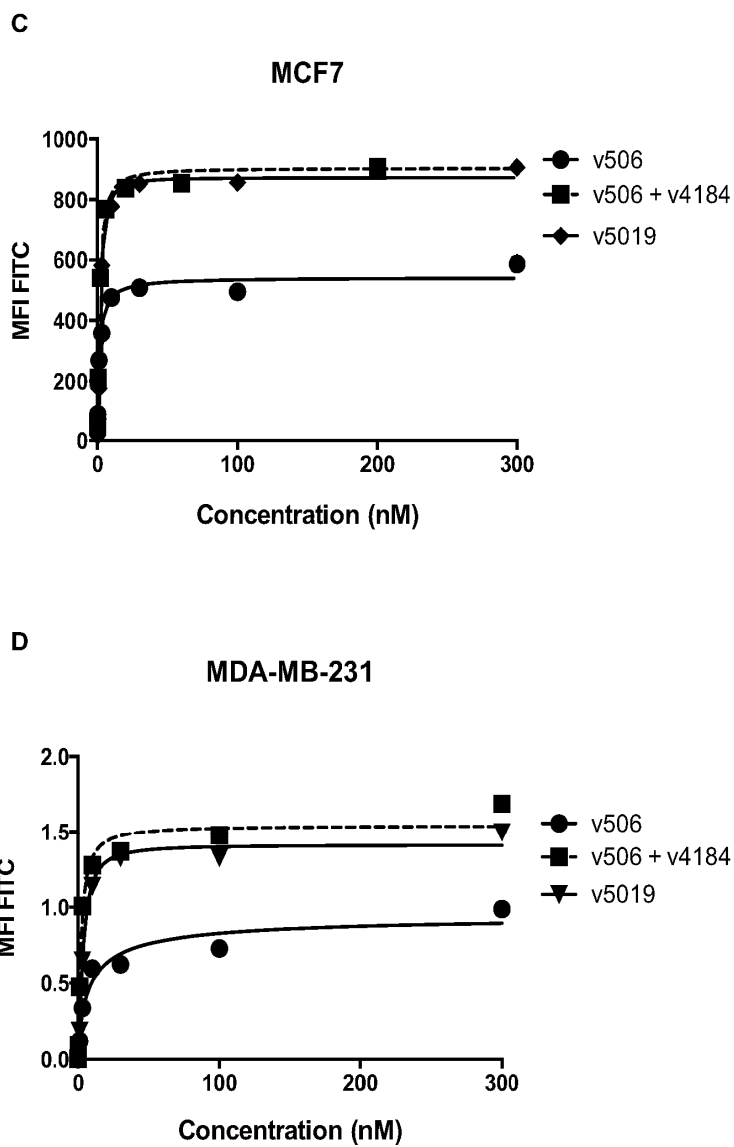


FIG. 6 (Cont'd...)

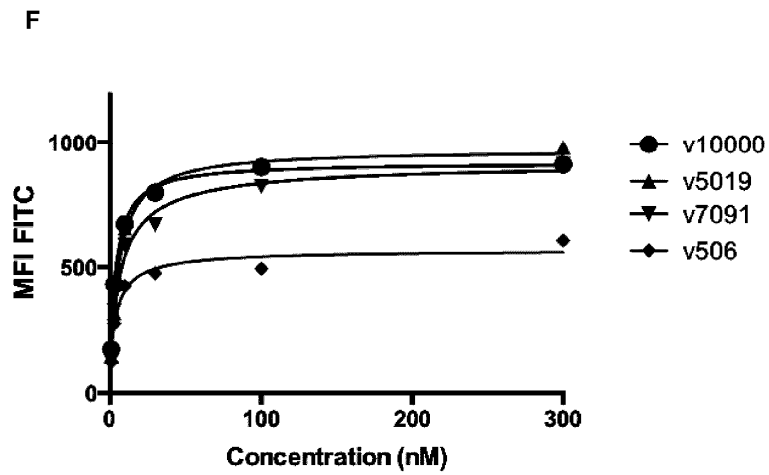
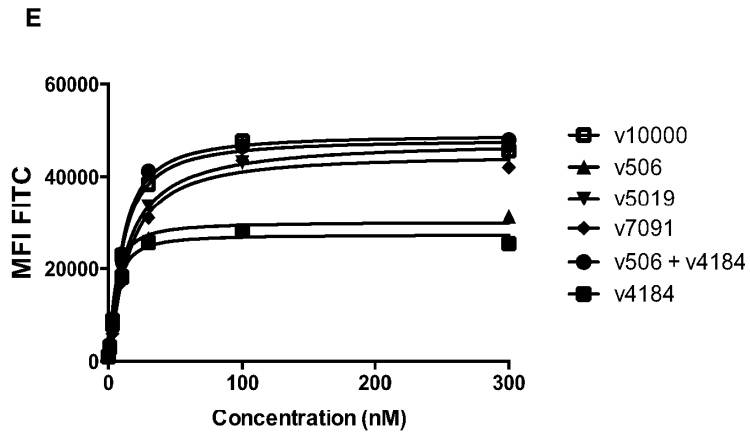


FIG. 6 (Cont'd...)

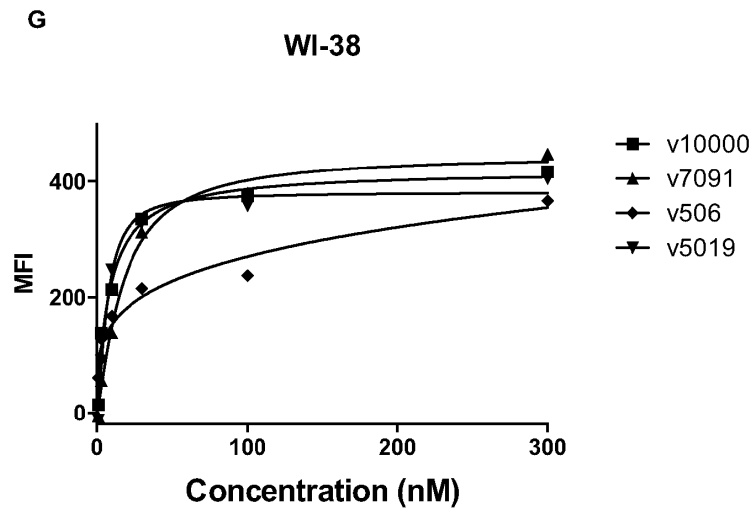


FIG. 6 (Cont'd...)

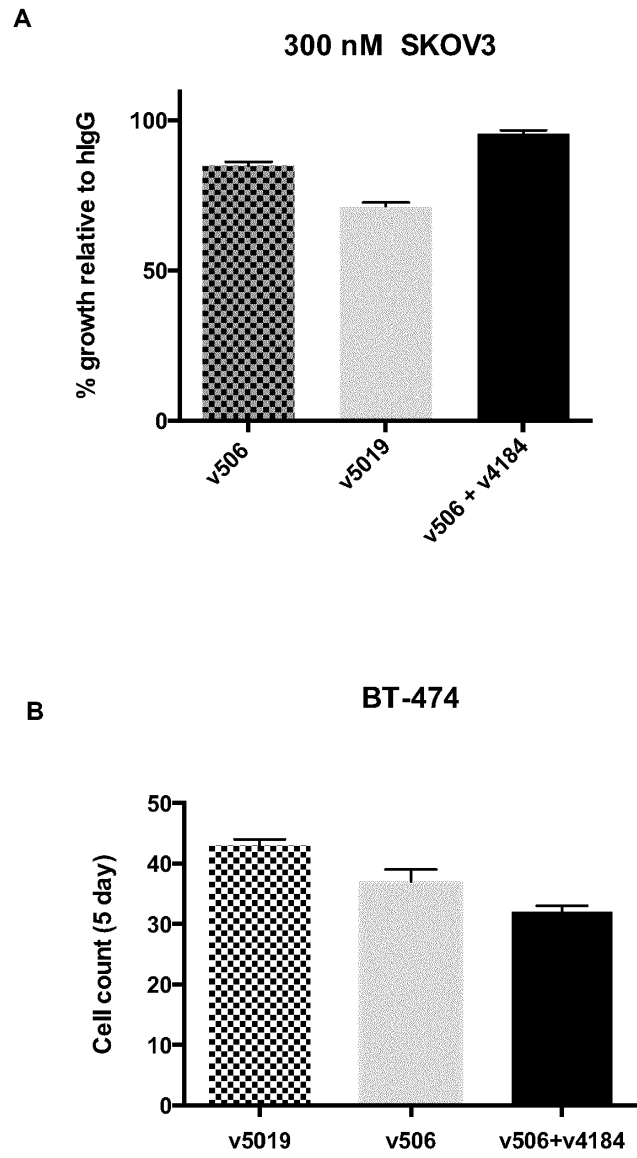


FIG. 7

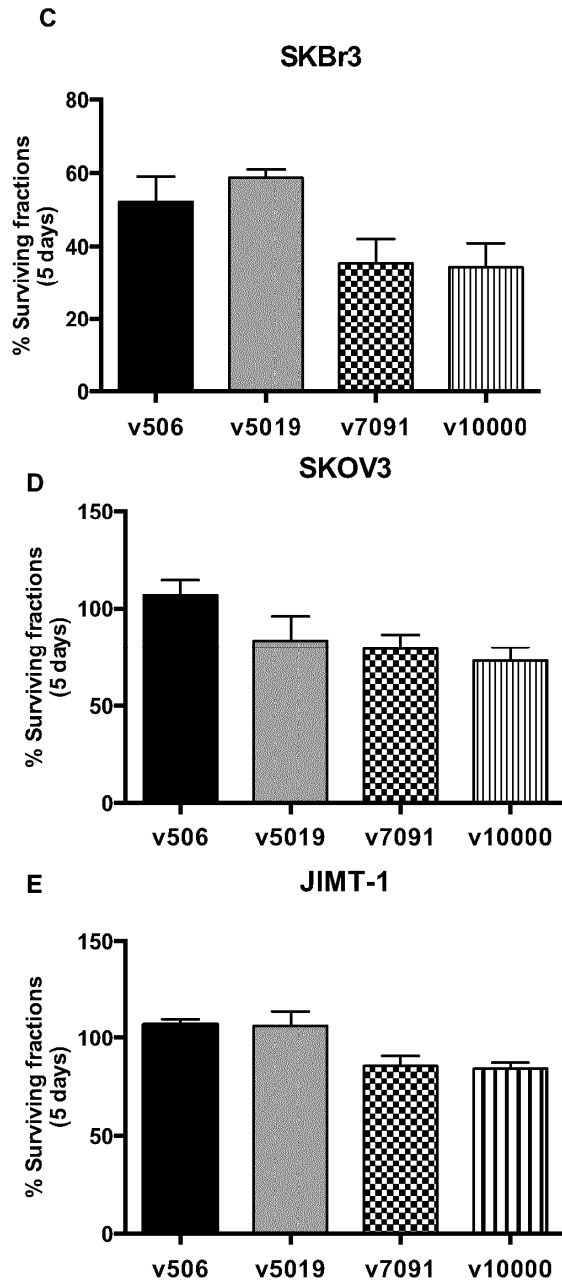


FIG. 7
(Cont'd...)

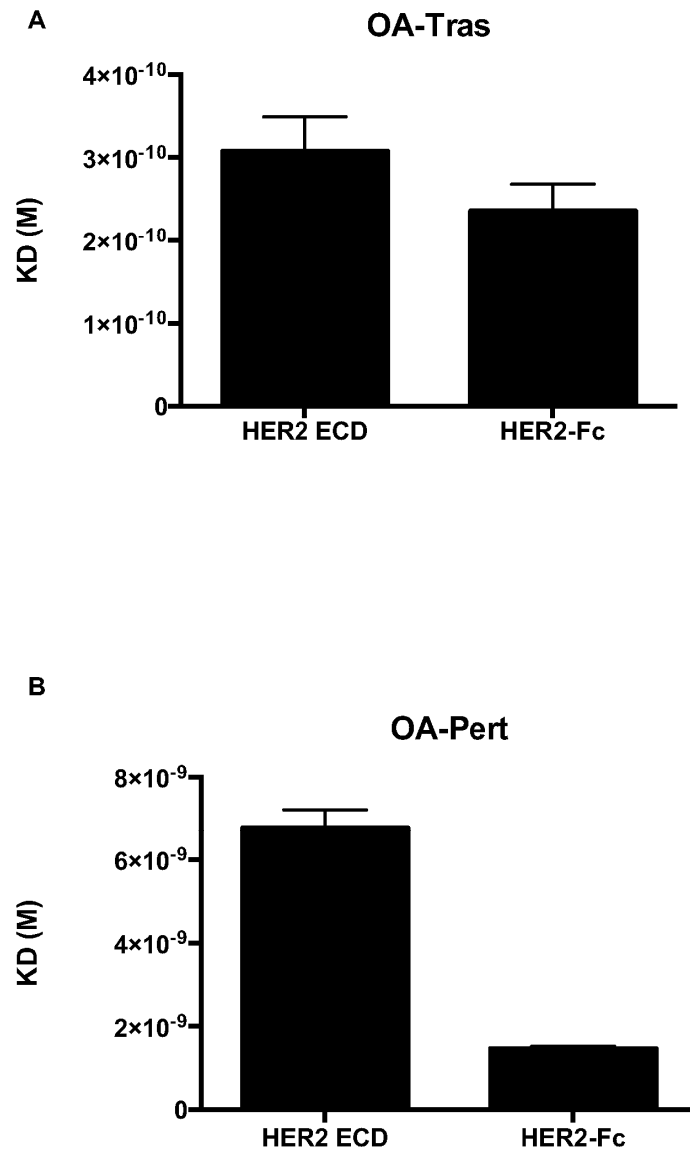
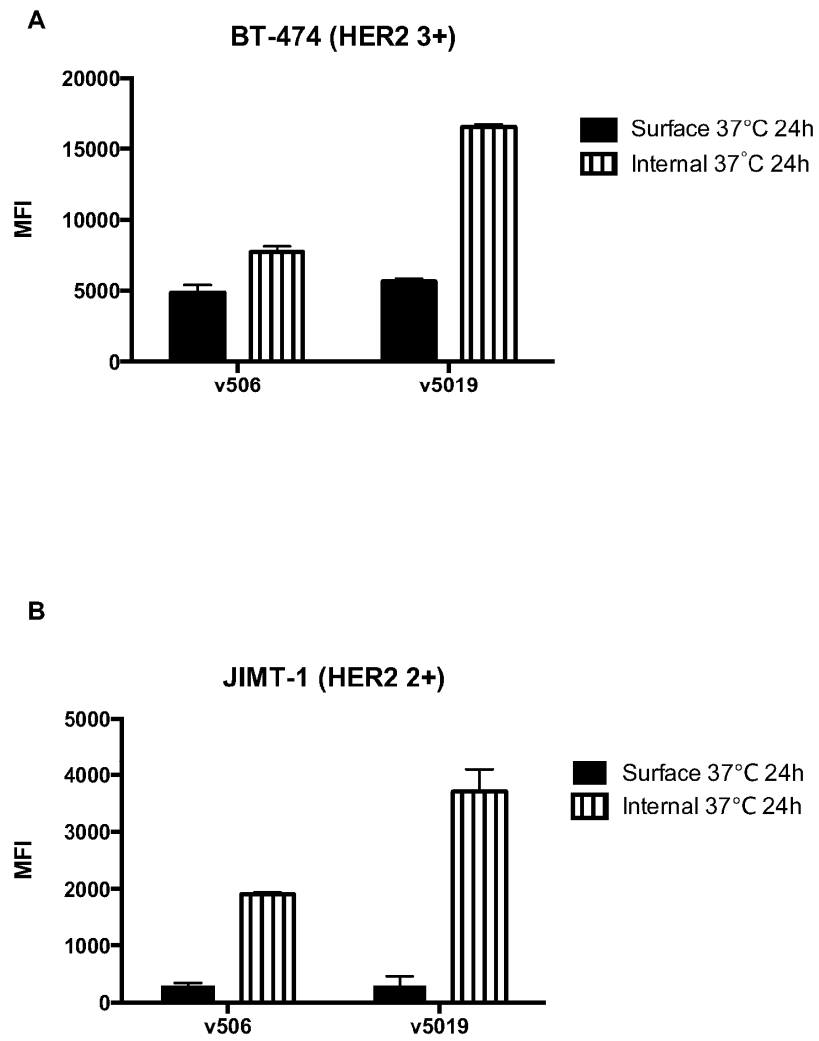


FIG. 8

**FIG. 9**

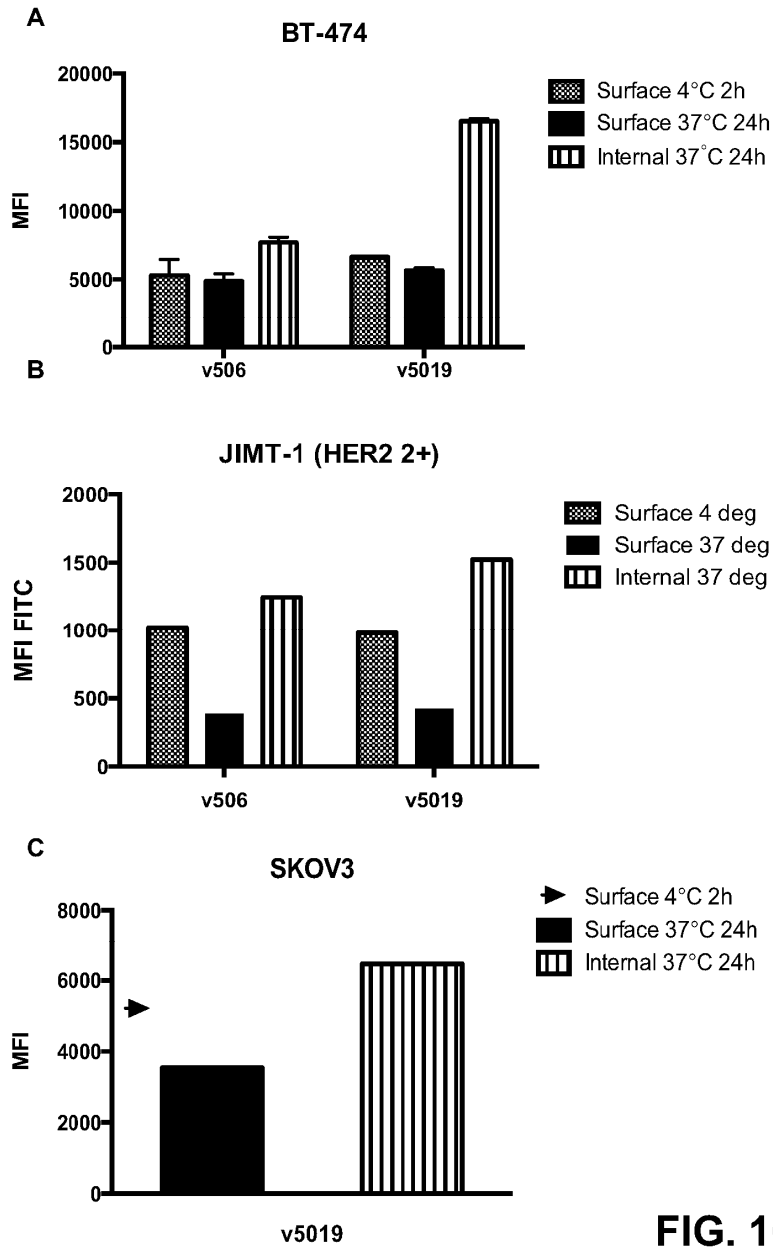


FIG. 10

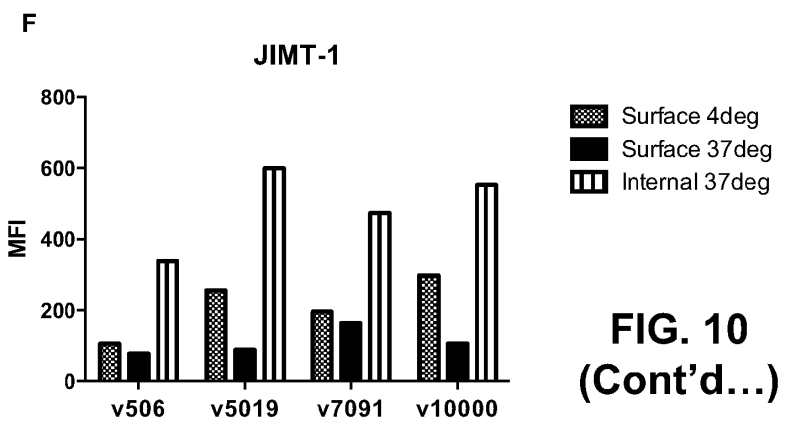
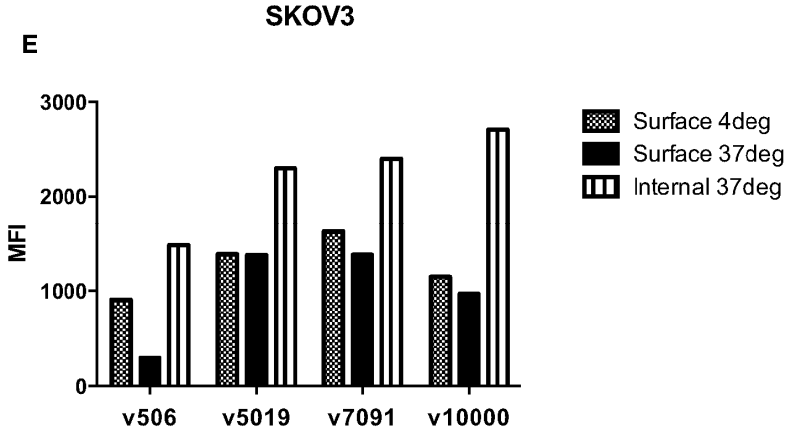
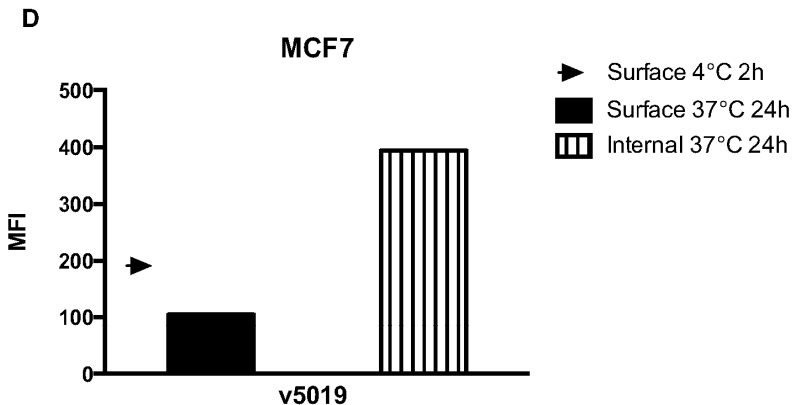


FIG. 10
(Cont'd...)

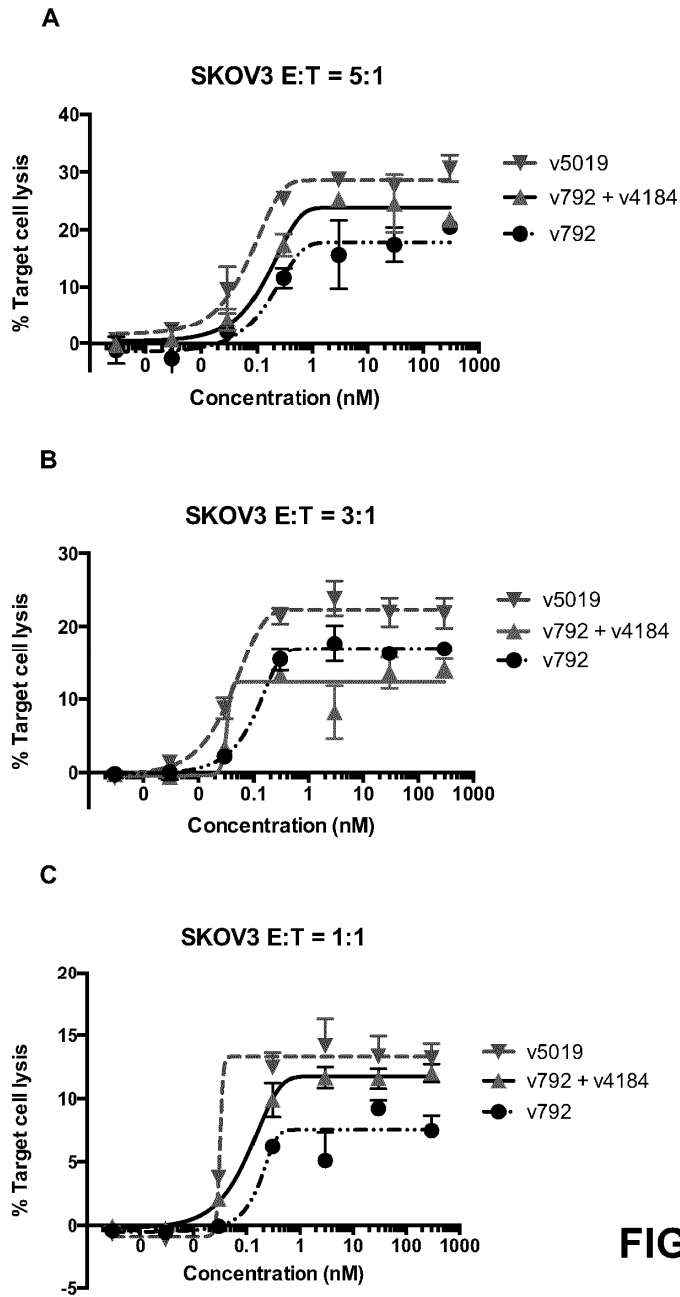


FIG. 11

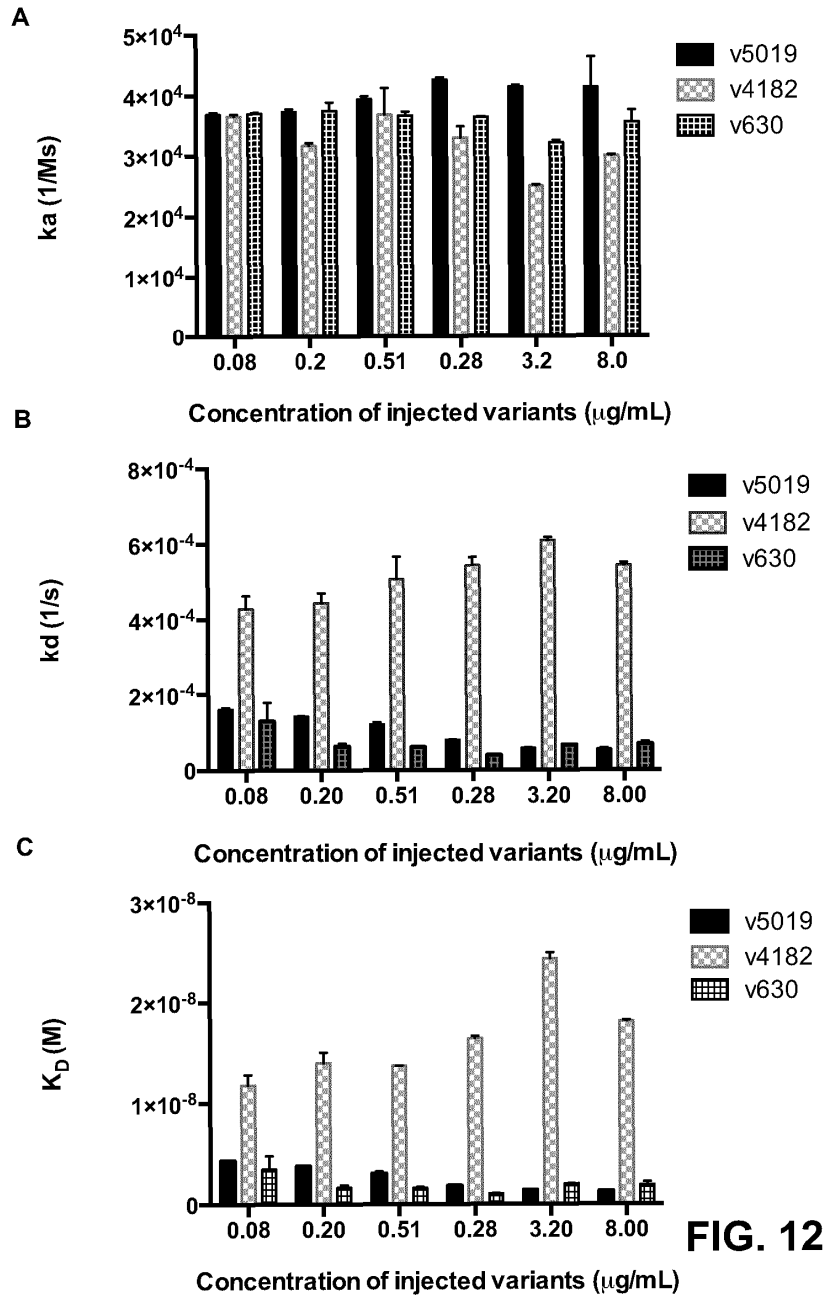


FIG. 12

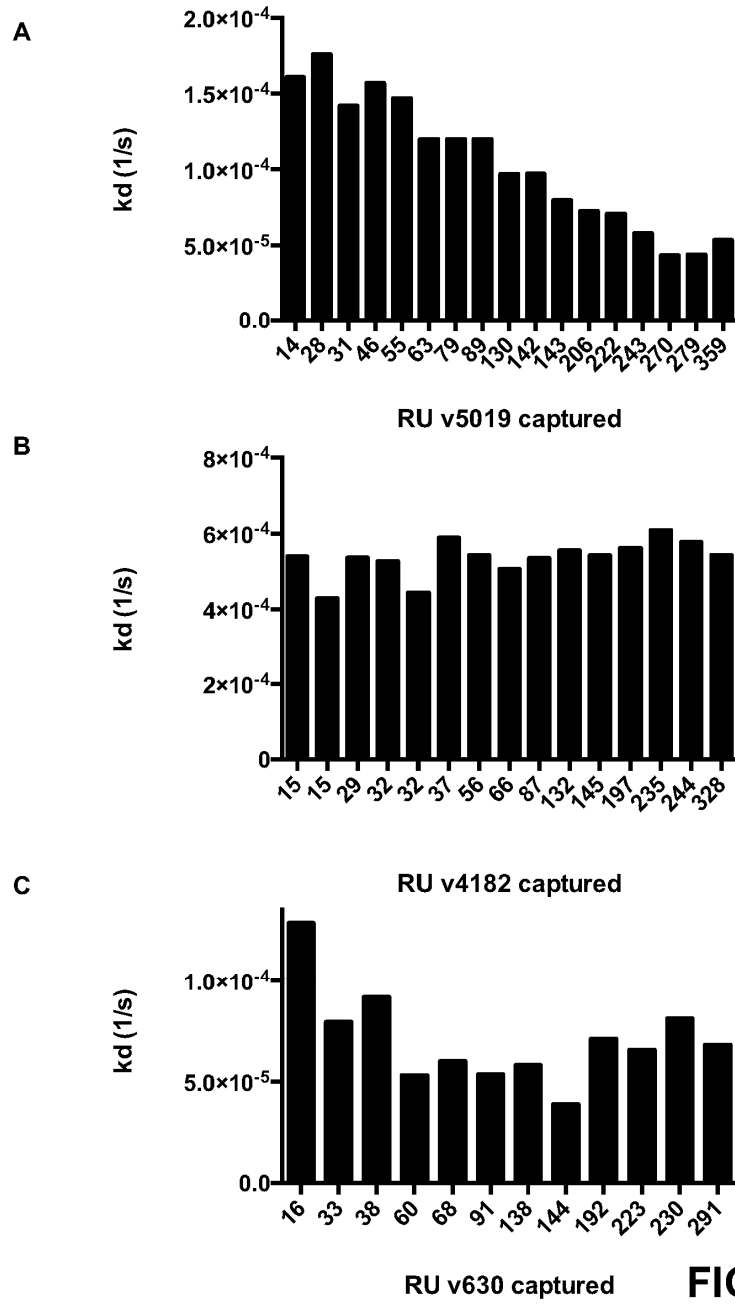


FIG. 13

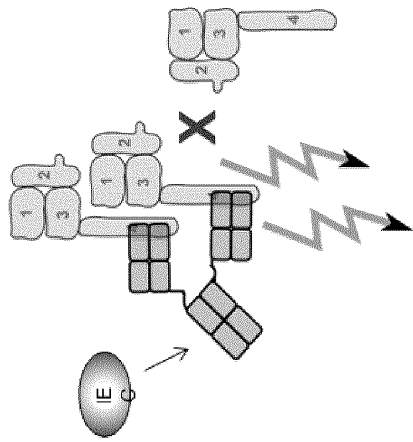
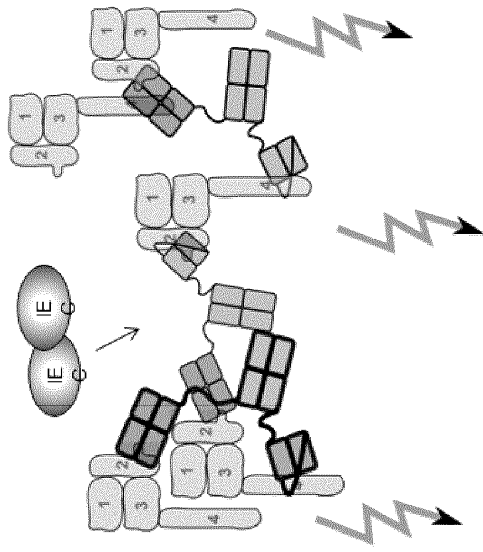


FIG. 14

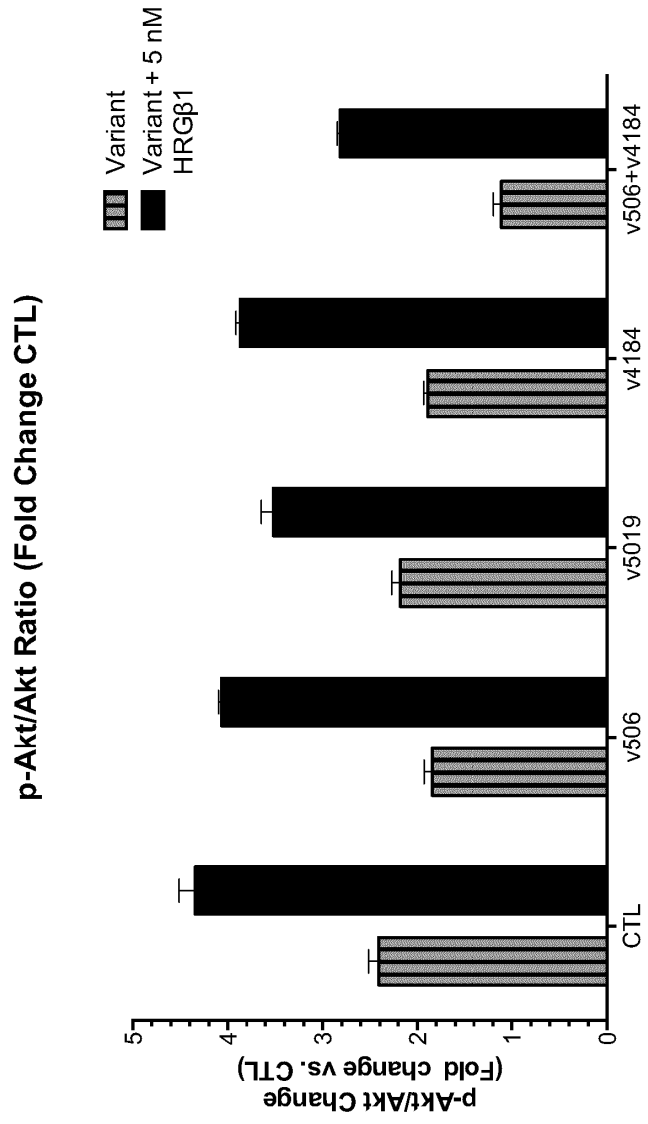


FIG. 15

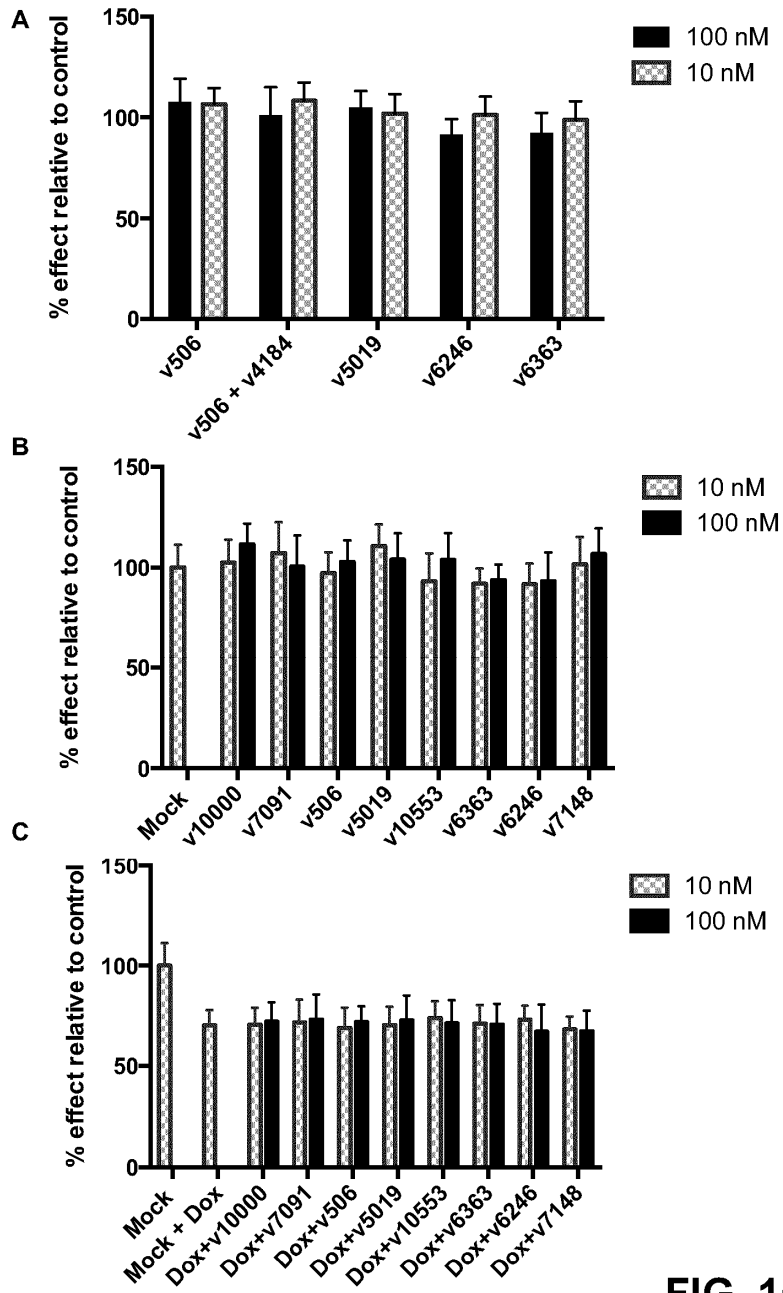
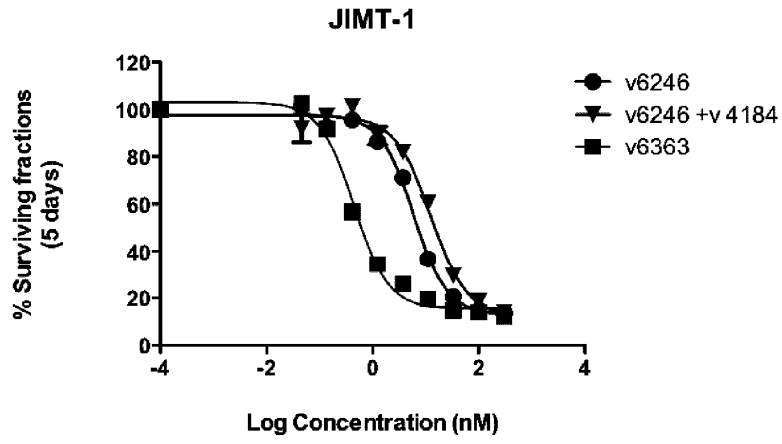


FIG. 16

A



B

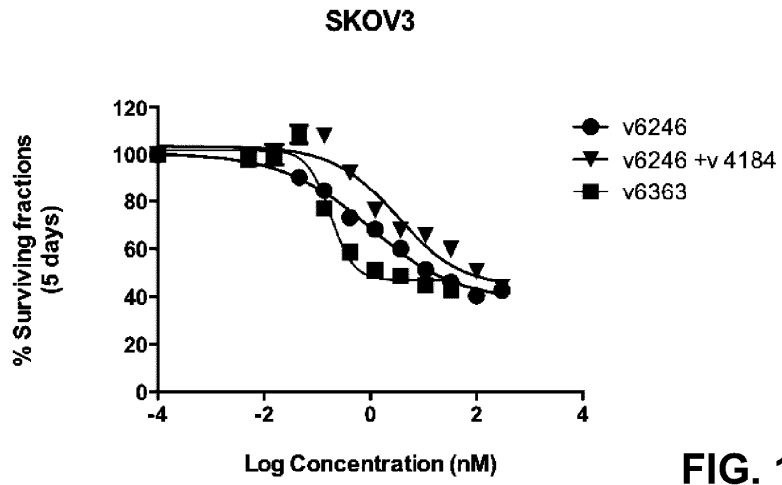


FIG. 17

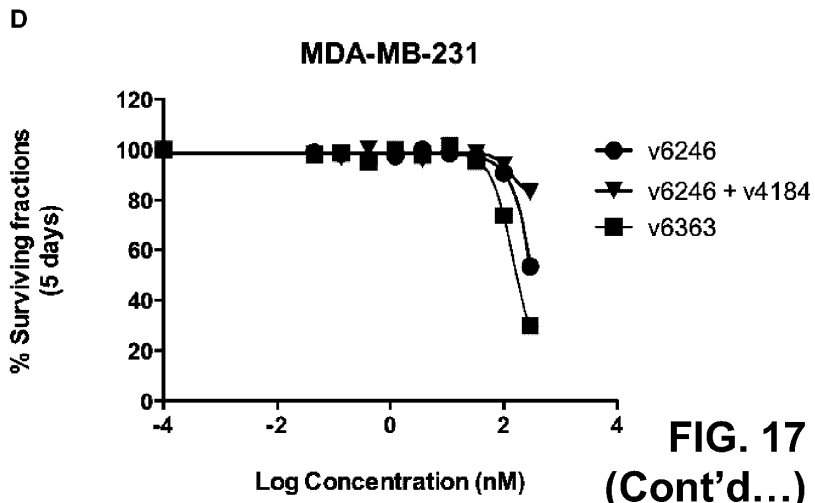
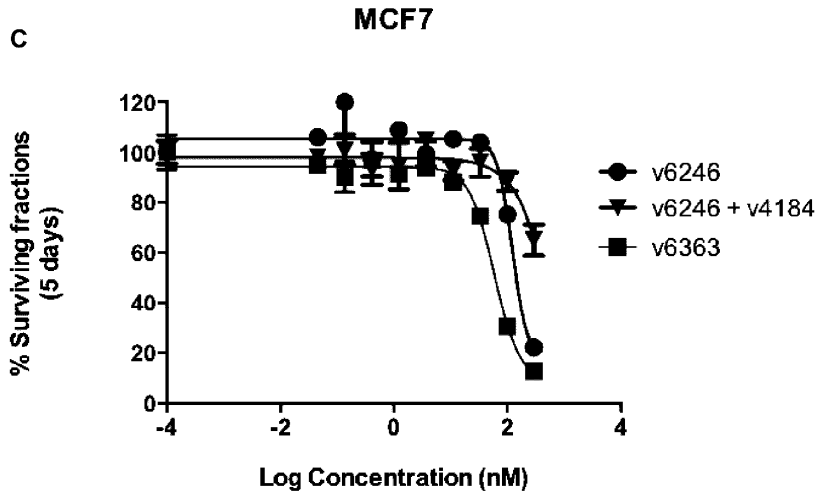


FIG. 17
(Cont'd...)

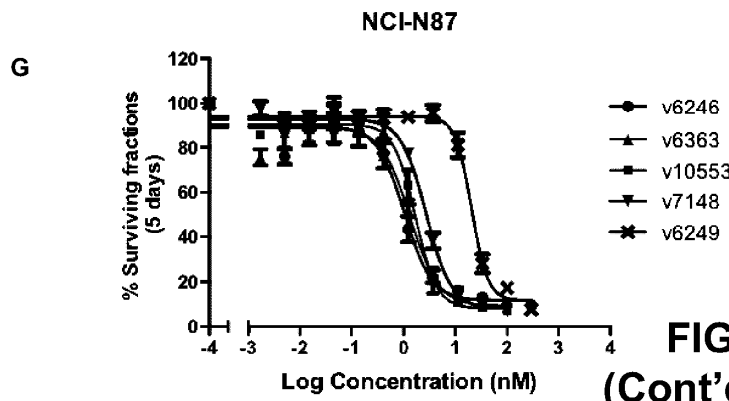
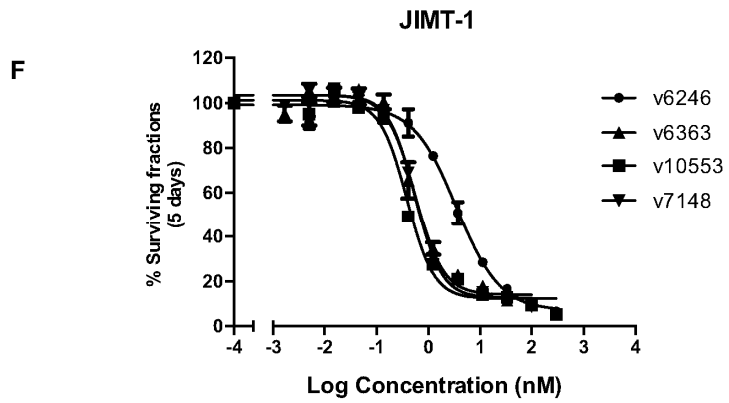
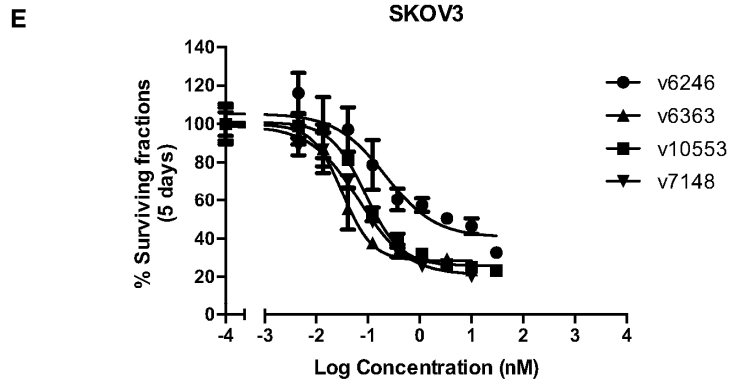


FIG. 17
(Cont'd...)

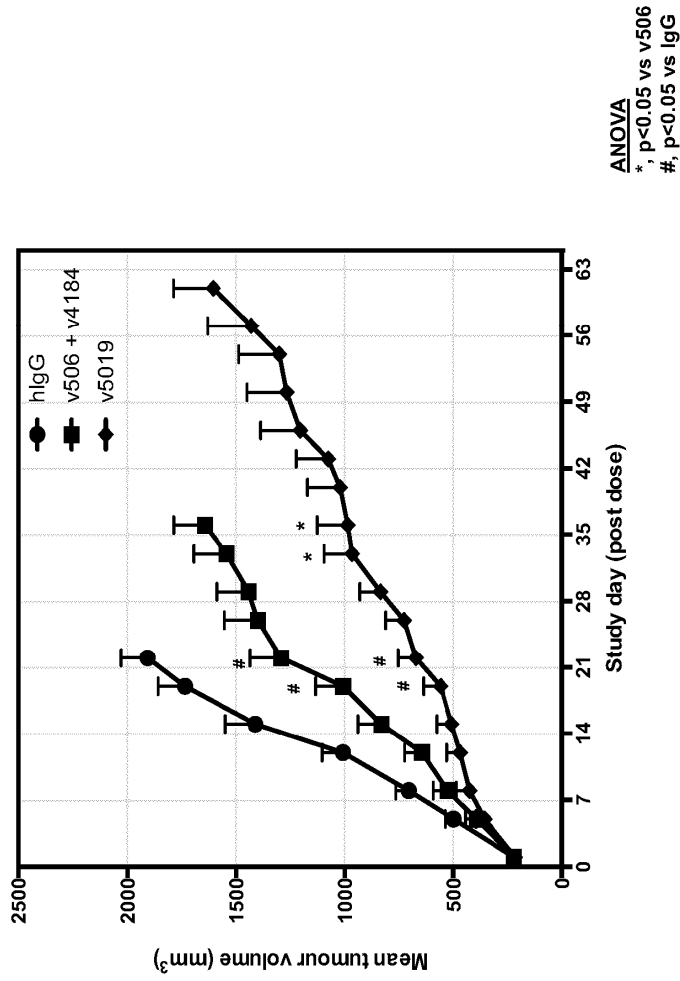


FIG. 18A

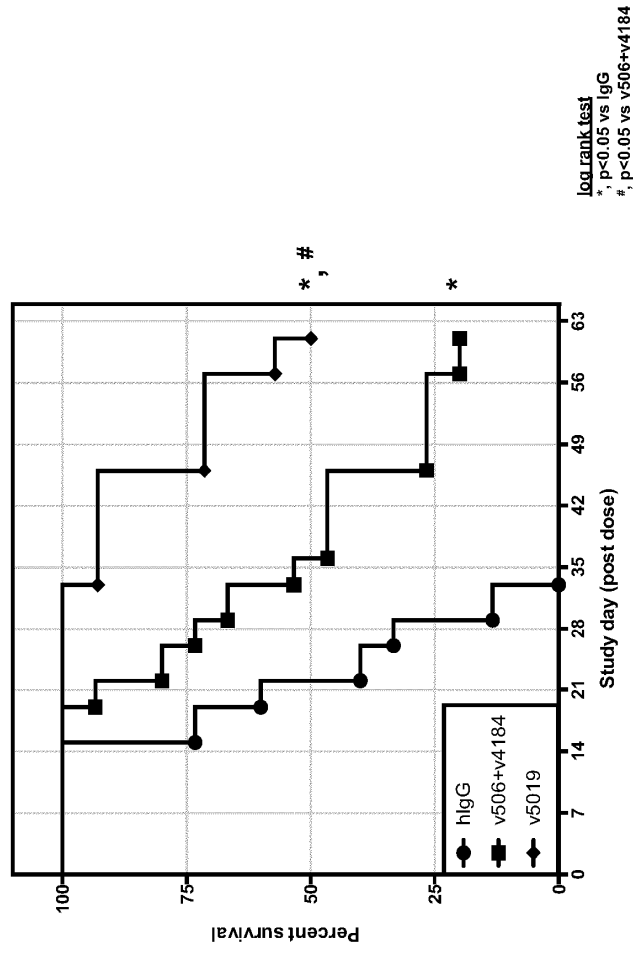


FIG. 18B

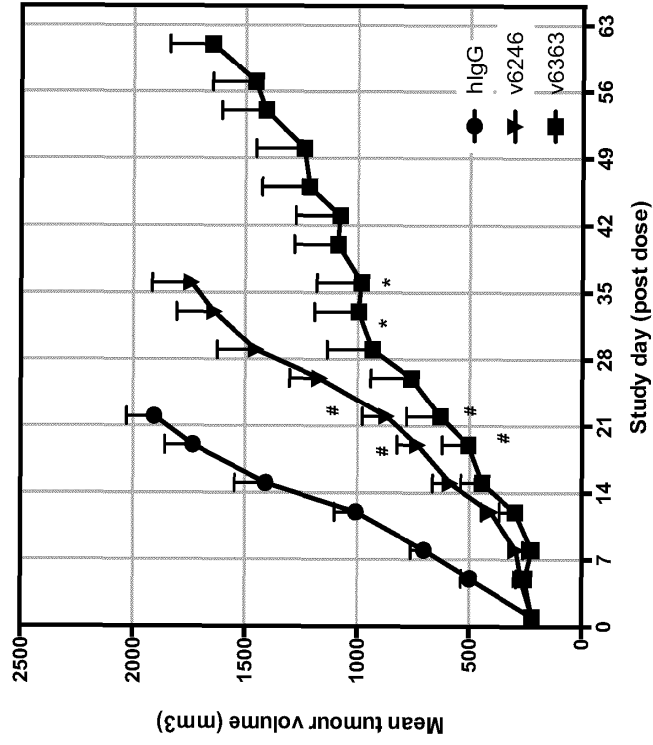


FIG. 19A

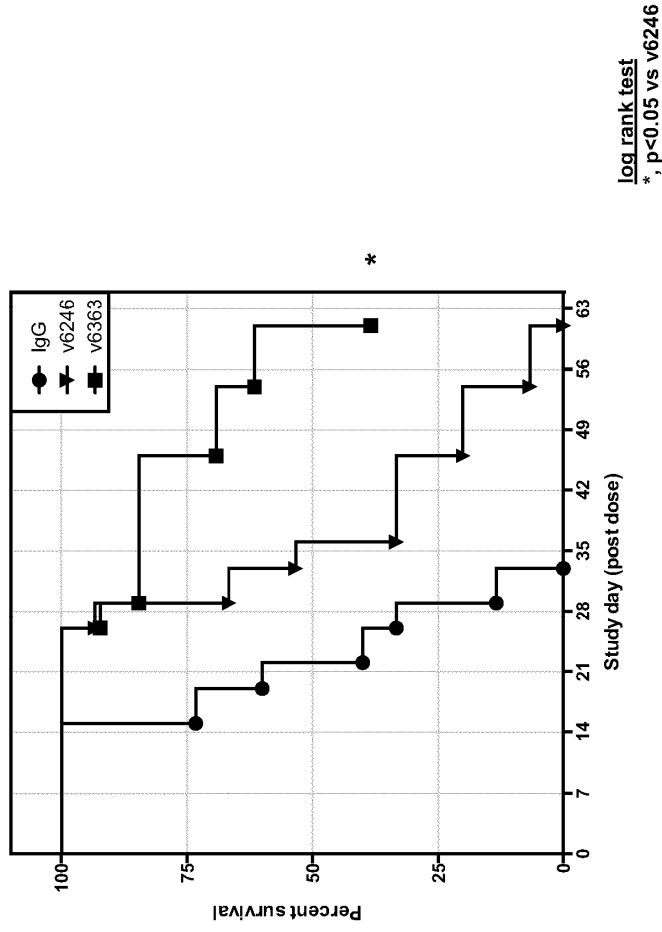


FIG. 19B

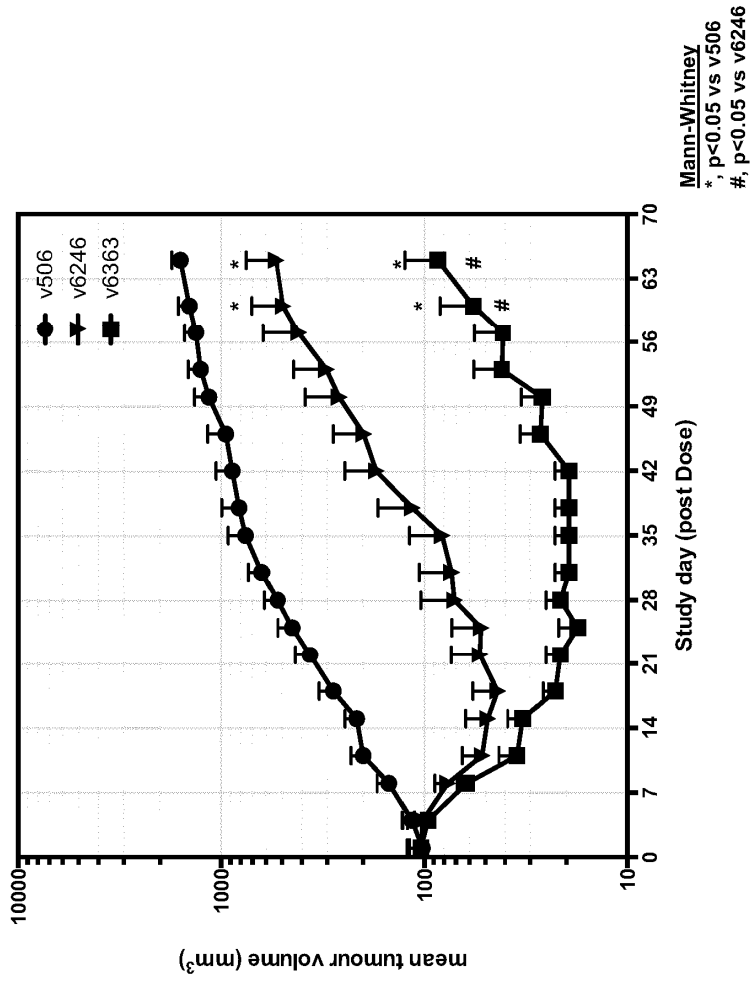
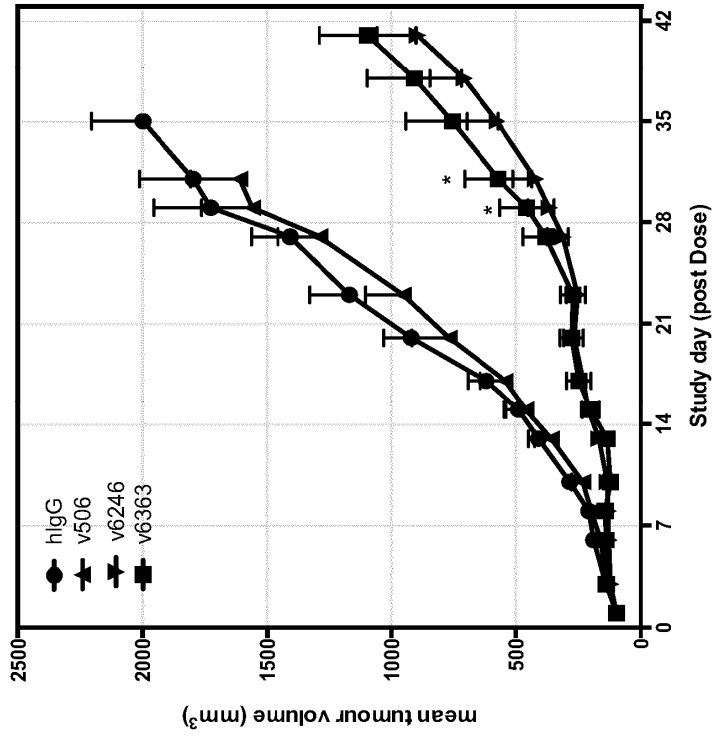


FIG. 20

Marco Giovanni Mari
USBM 6PT-090



Kruskal-Wallis
*, p<0.05 vs v506

FIG. 21

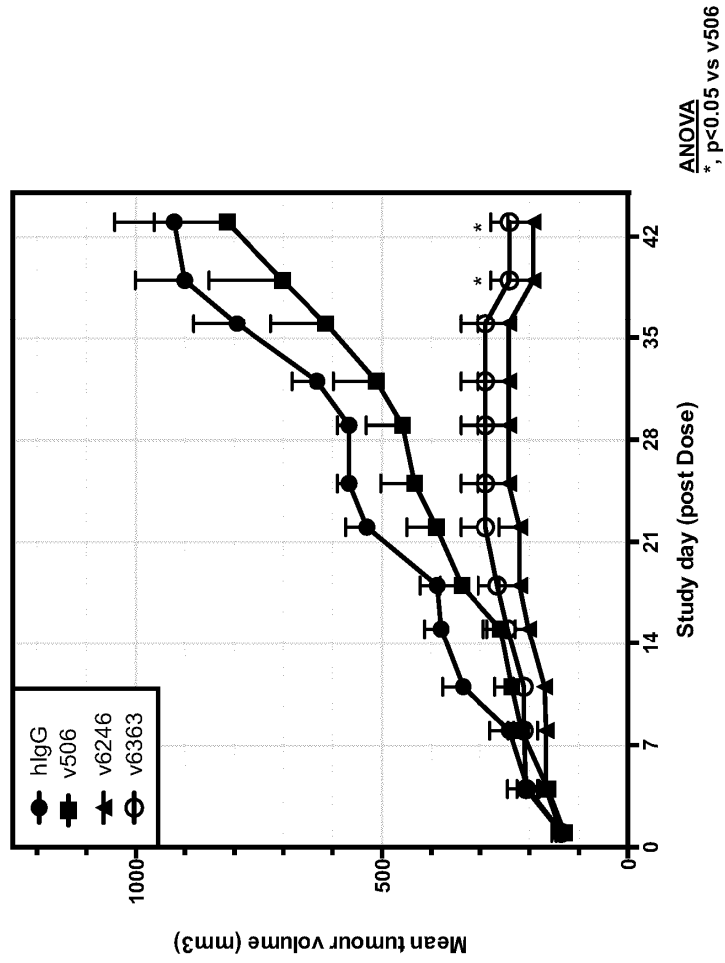


FIG. 22

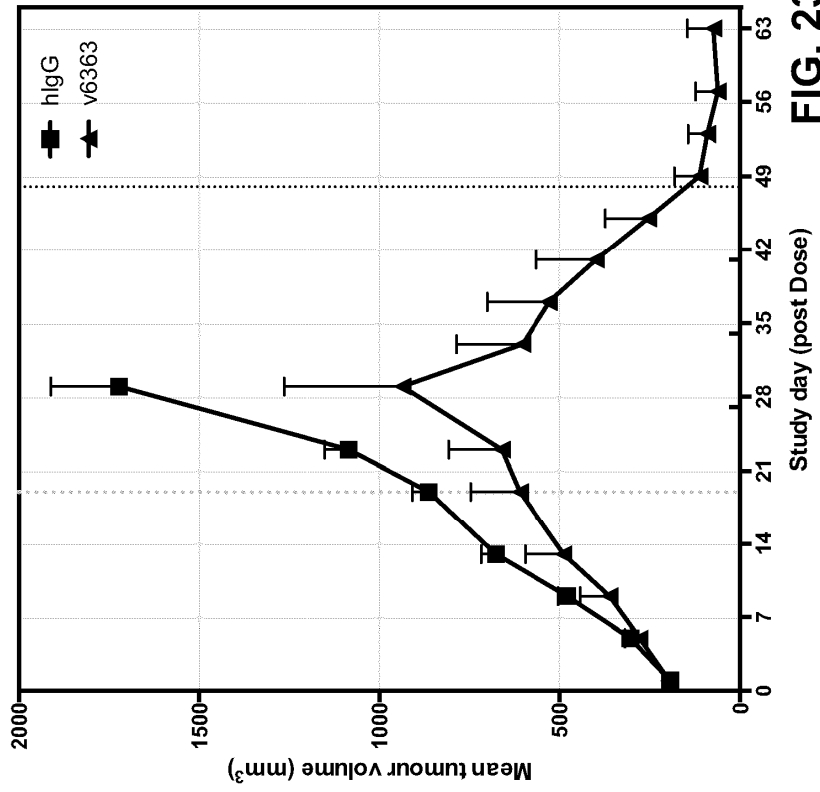


FIG. 23

Marco Giovanni Mari
USM-PT-090

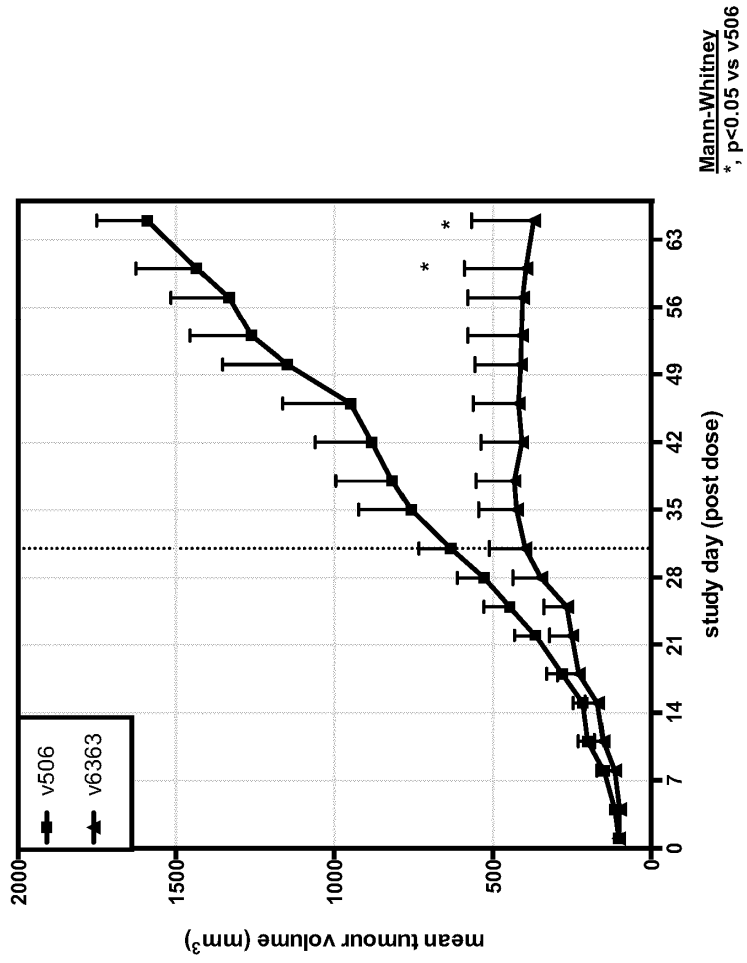


FIG. 24

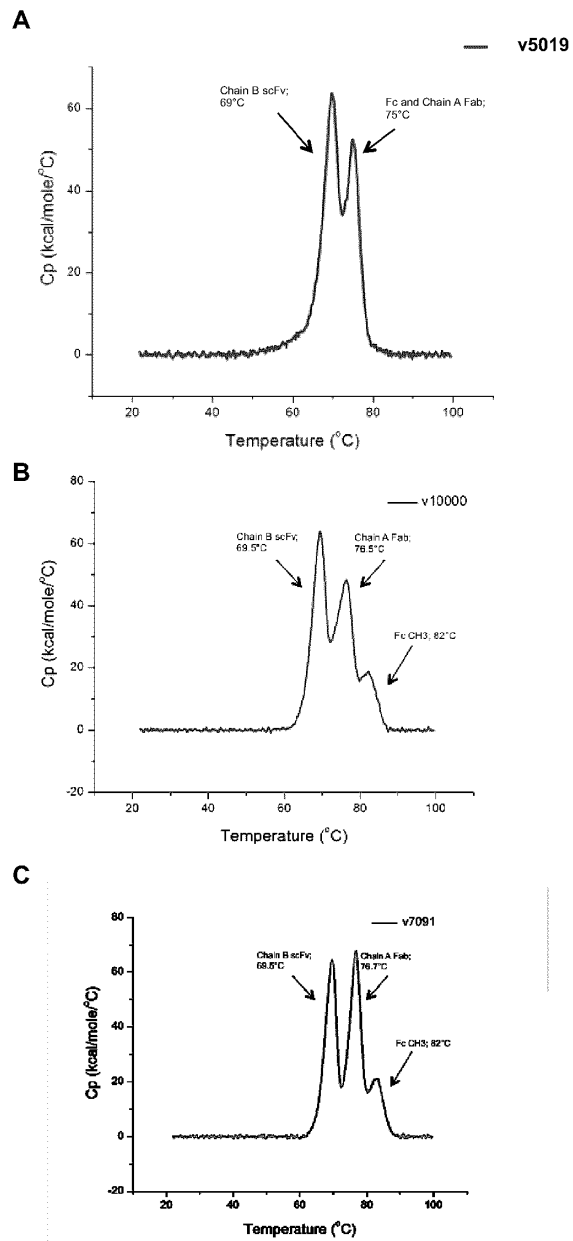


FIG. 25

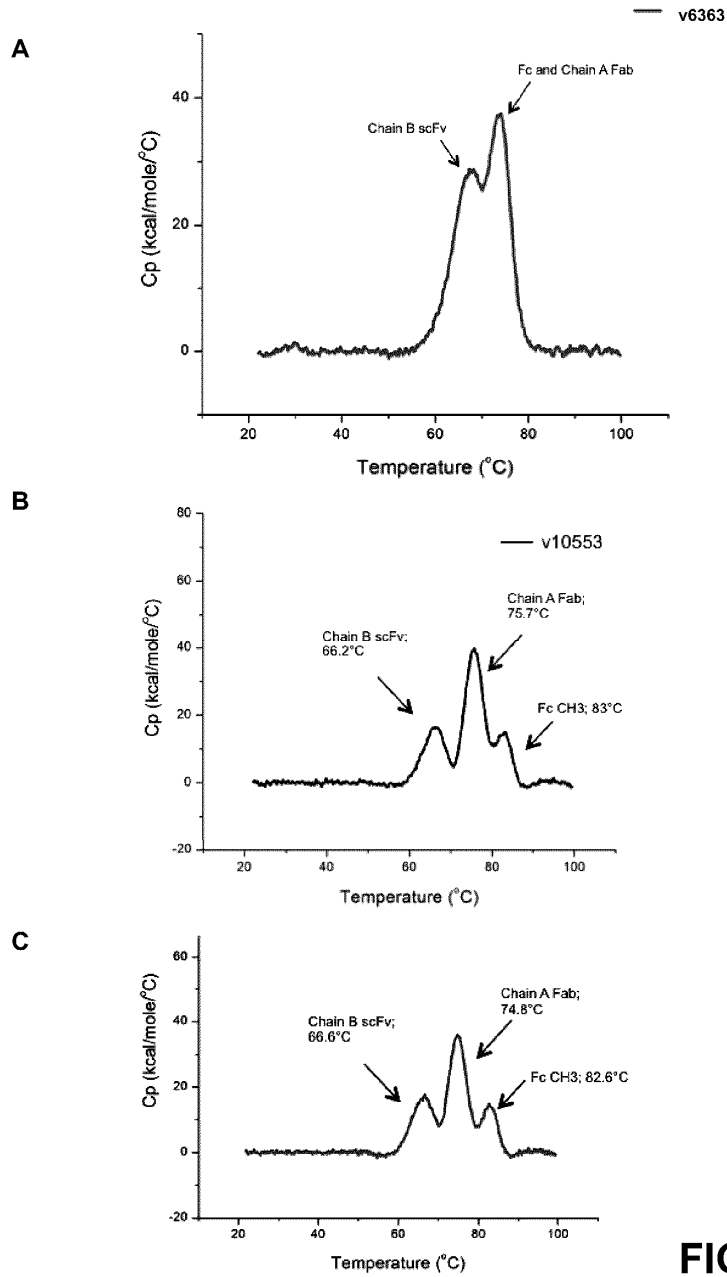


FIG. 26

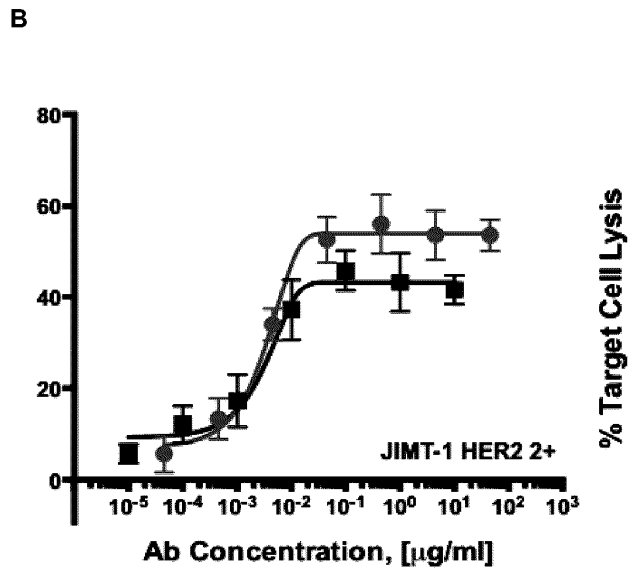
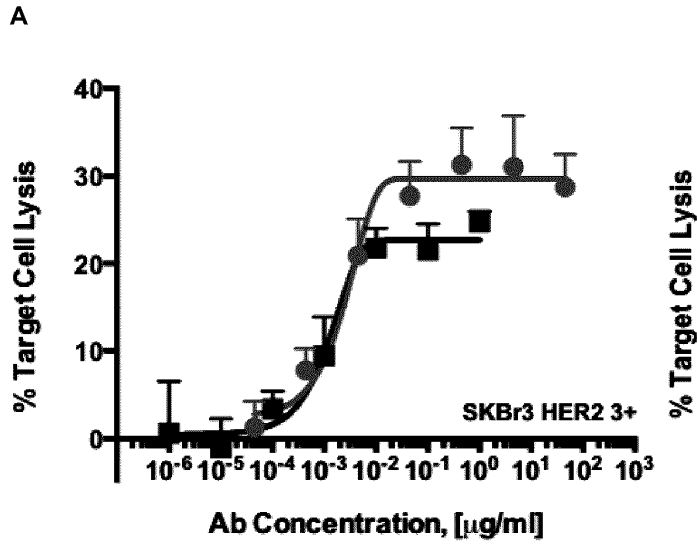


FIG. 27

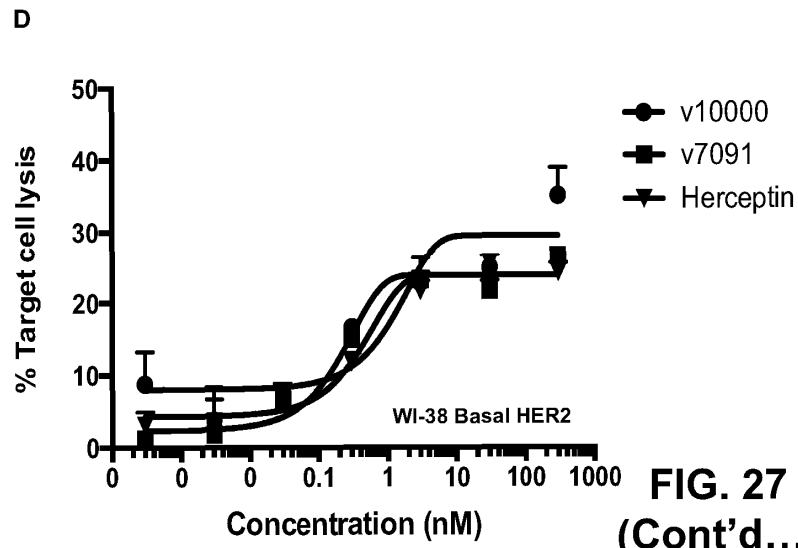
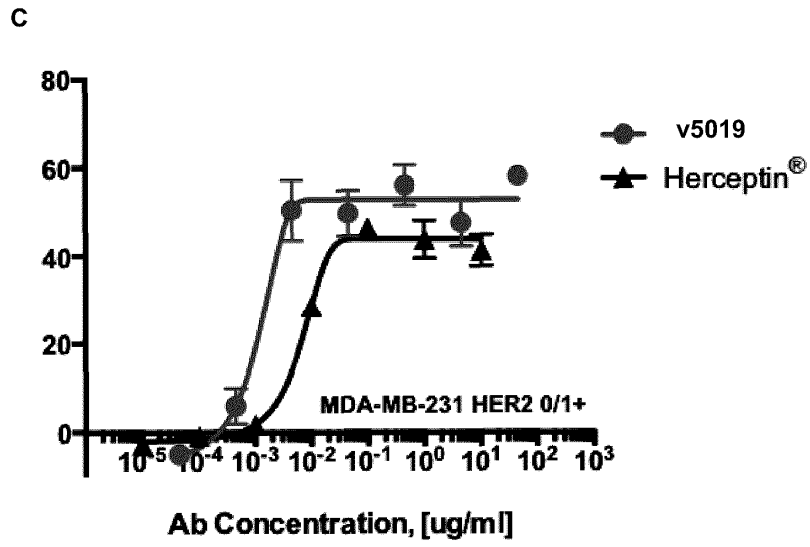
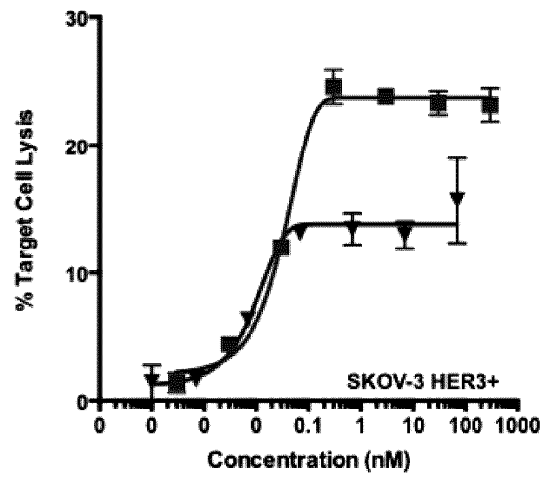


FIG. 27
(Cont'd...)

A



B

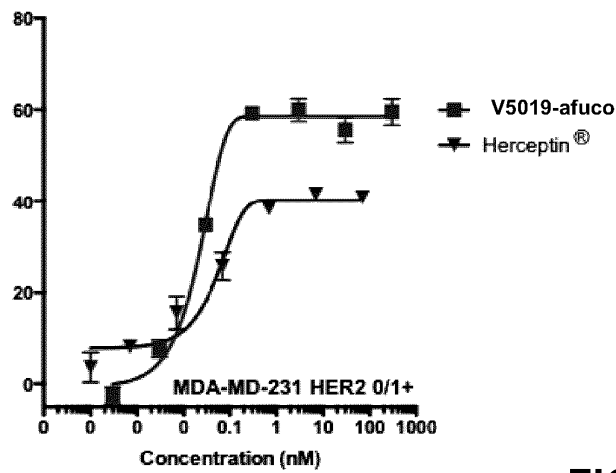


FIG. 28

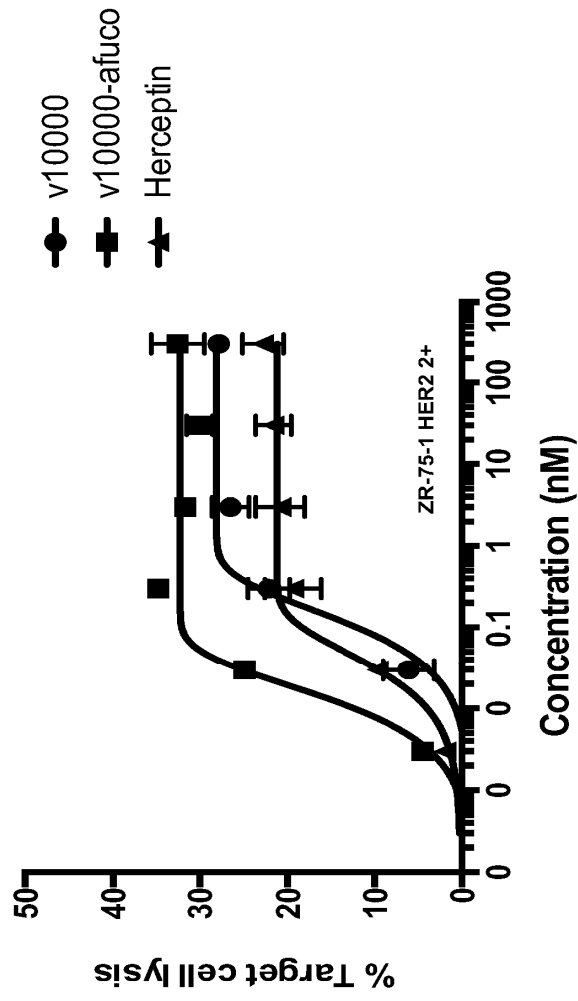


FIG. 28C

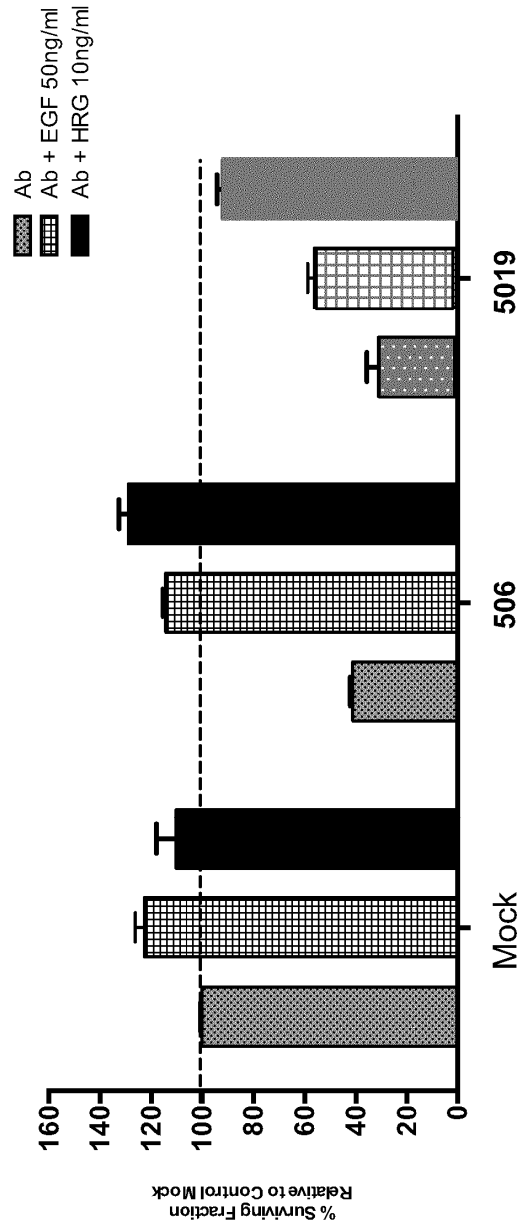


FIG. 29

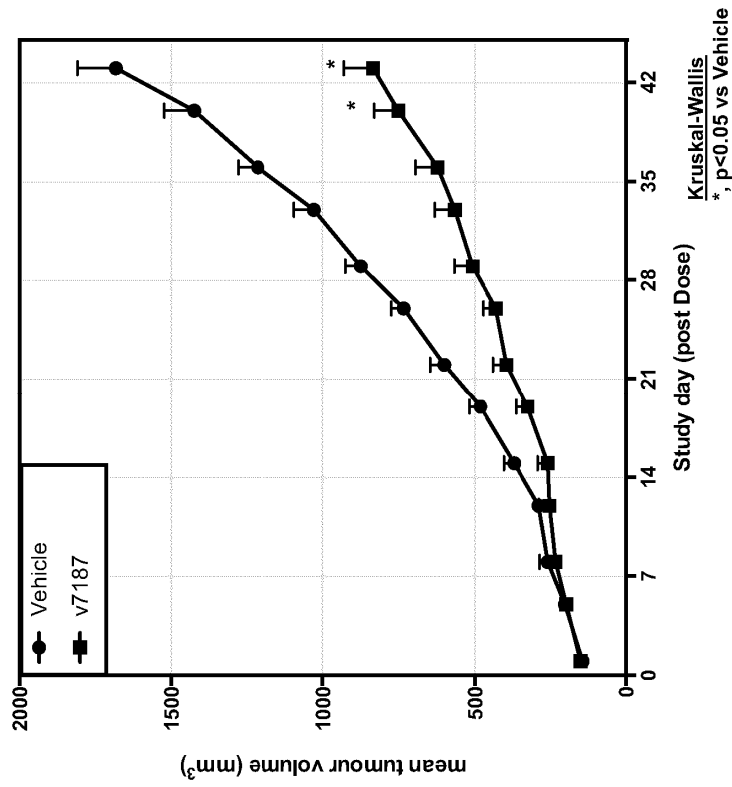
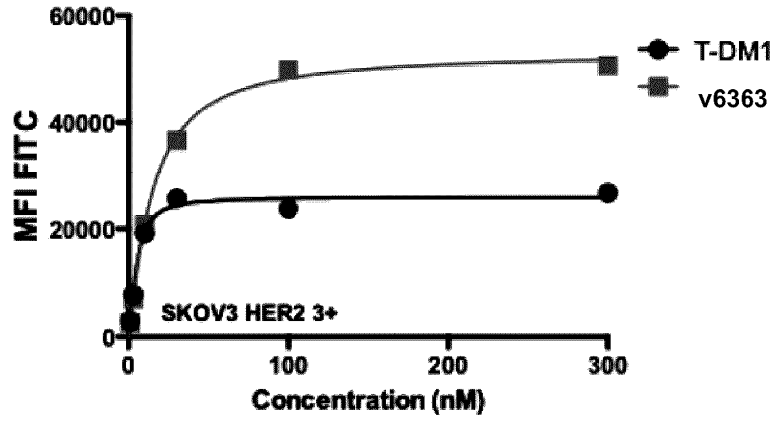


FIG. 30

Marco Giovanni Mari
USBM 6PT-090

A



B

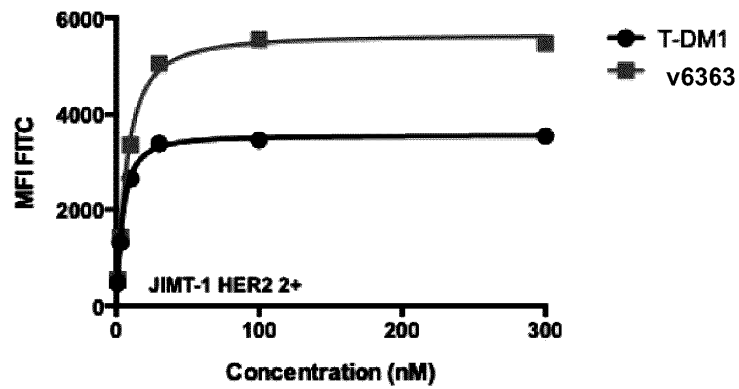


FIG. 31

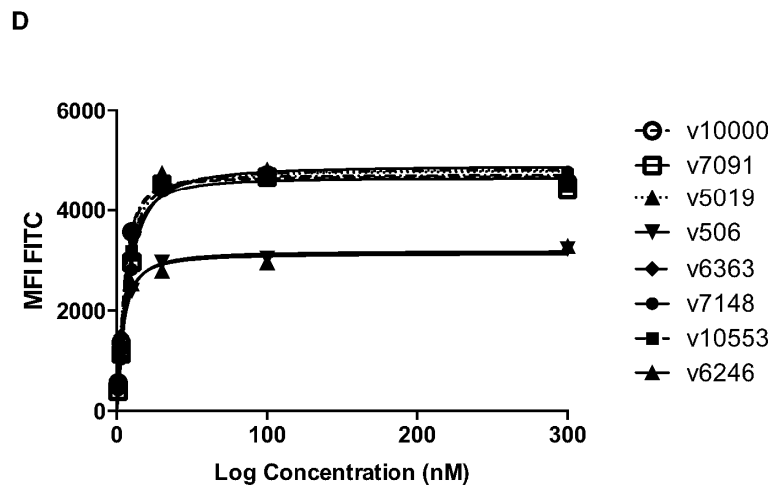
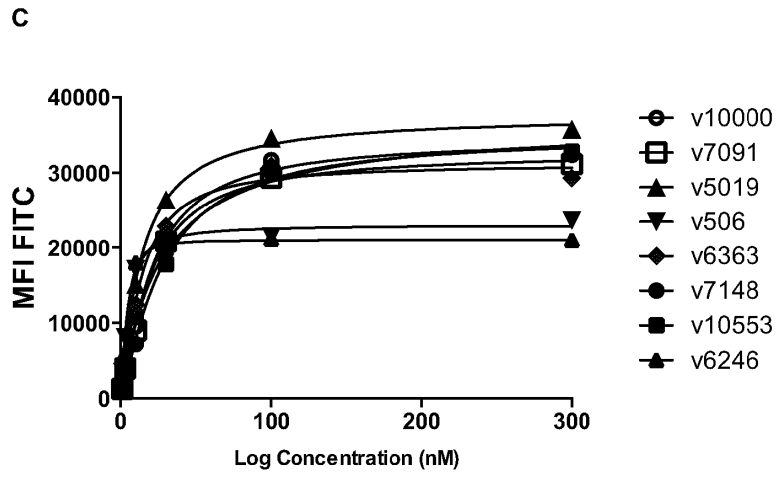


FIG. 31 (Cont'd...)

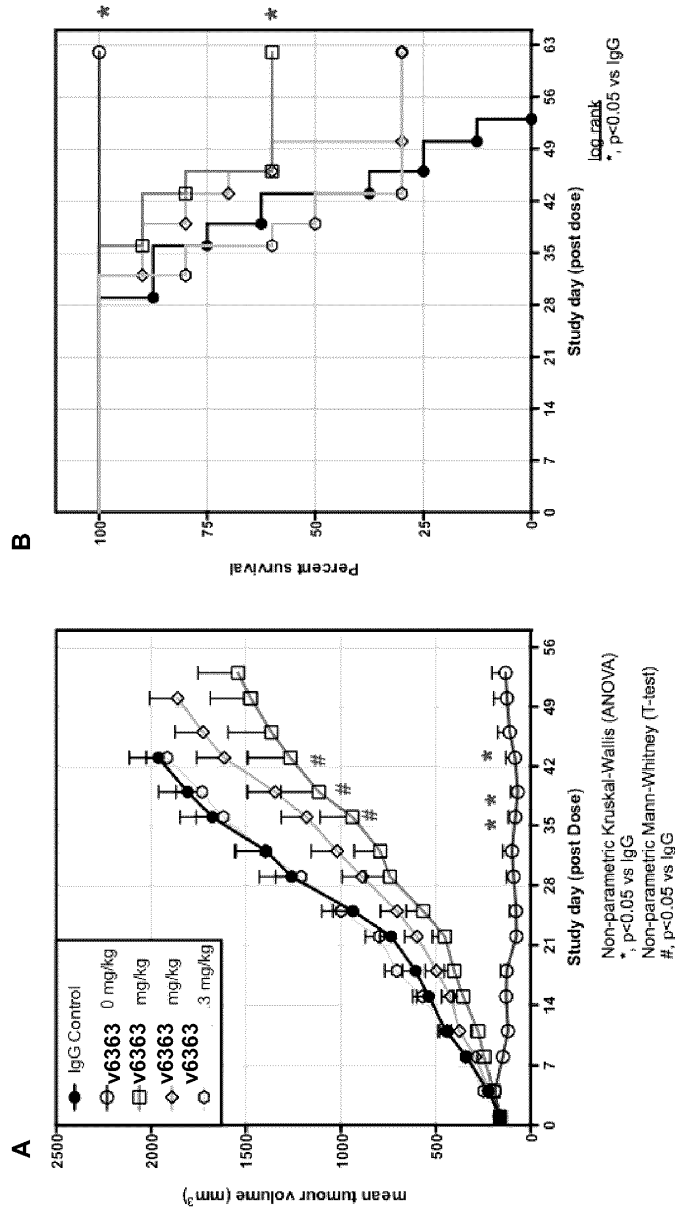


FIG. 32

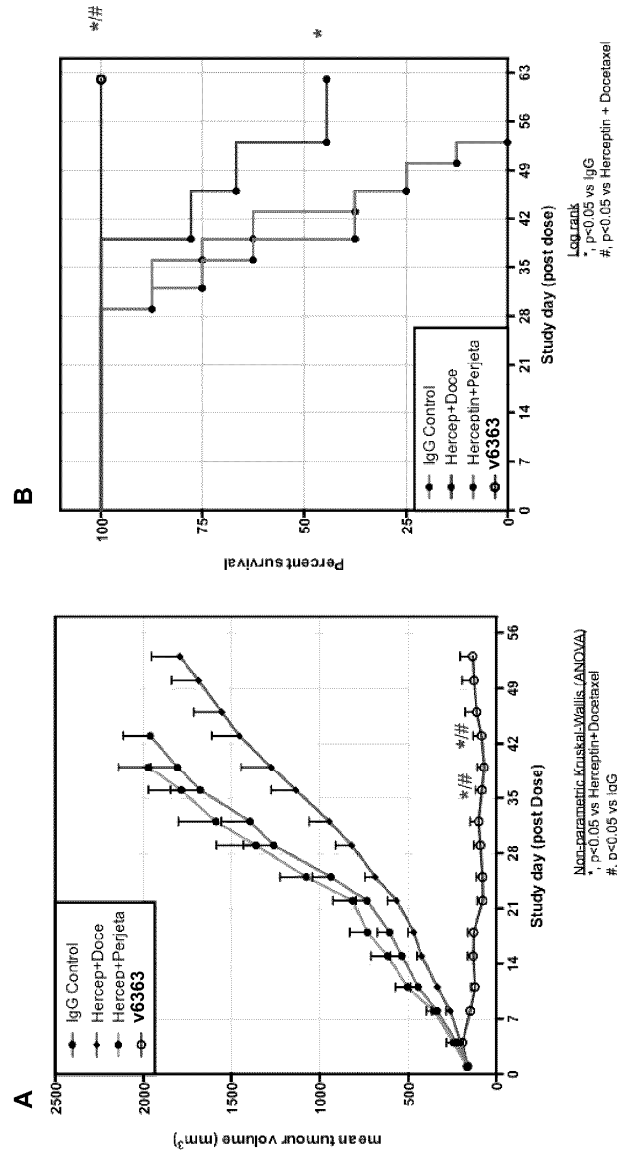


FIG. 33

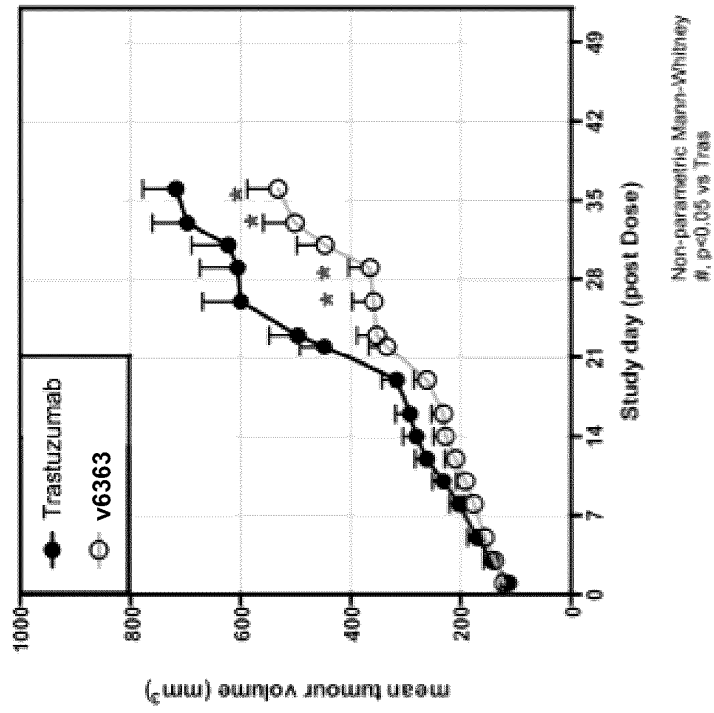


FIG. 34

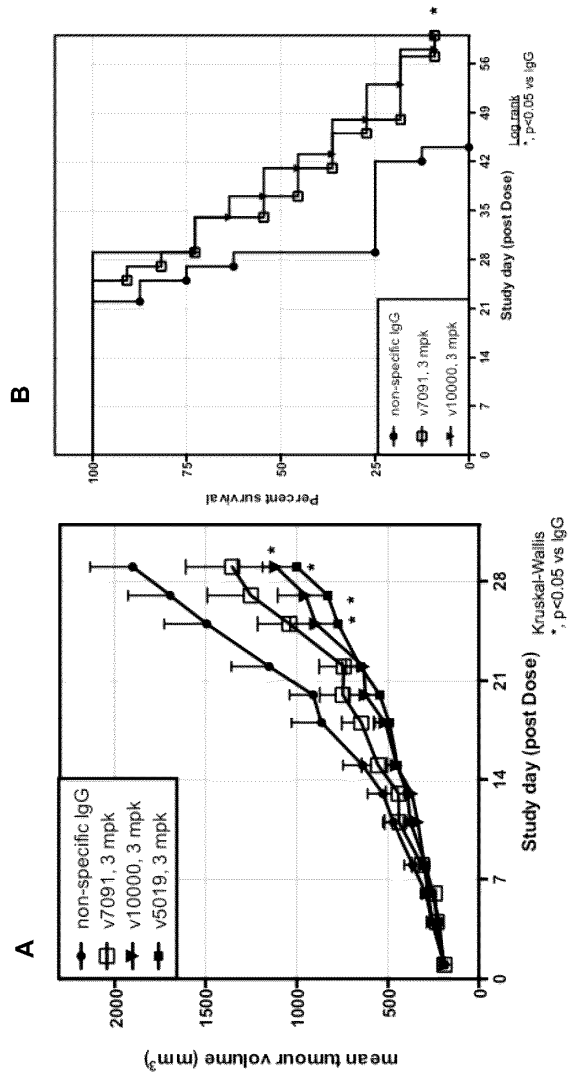


FIG. 35

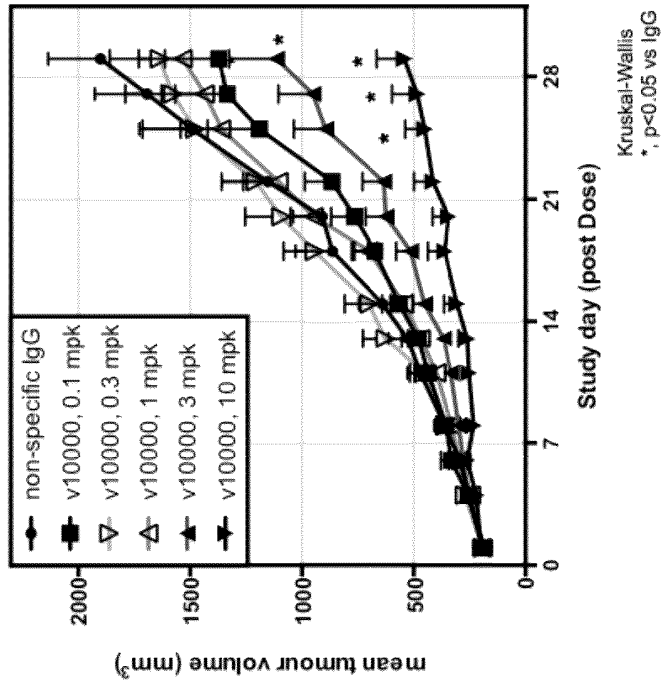


FIG. 36

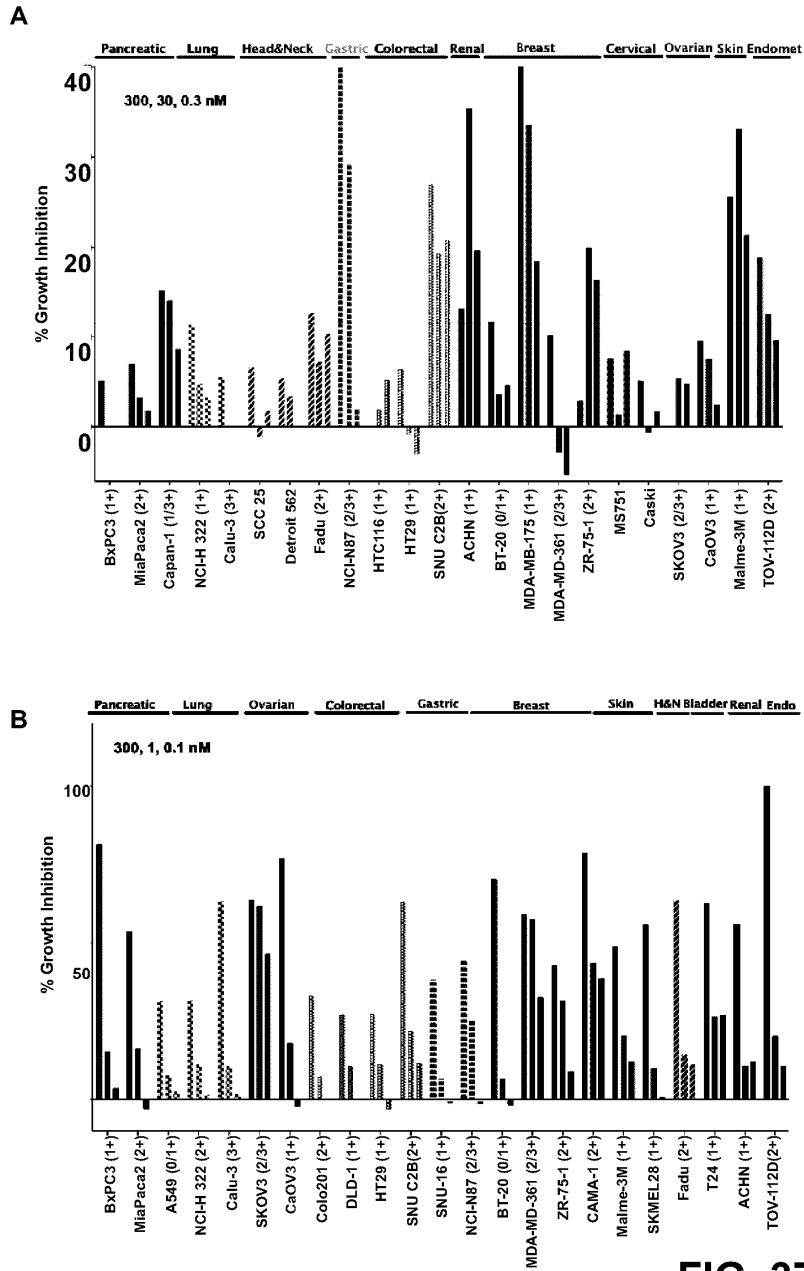


FIG. 37

Cell Line	Cell Line Description	IHC Receptor			V1000	V10553	Ref
		HER2	EGFR	HER3	activity	activity	
BxPC3	human pancreas adenocarcinoma	1	2	1	+	+	1,2,3
Capan-1	human pancreatic adenocarcinoma	1/3	1	0	+	+	1,4,5
MiaPaca2	human pancreas carcinoma	2	1/2	0	+	+	3,4
SW 1990	human pancreas adenocarcinoma, metastatic	2	1	0	-	+	2,4
Panel	human pancreas carcinoma	1	1/2		-	+	4
A549	human lung carcinoma	0/1	1		-	+	6,7
Calu-3	human lung adenocarcinoma	3	2	1	+	+	6,8,9
Calu-6	human lung anaplastic carcinoma	0			-	+	6
NCI-H2126	human adenocarcinoma; non-small cell lung cancer				-	+	10
NCI-H322	human Caucasian bronchioalveolar carcinoma	2	2		+	+	6,7,11
Detroit 562	human pharyngeal carcinoma				+	+	12
SCC-15	human tongue squamous cell carcinoma		2		-	+	12
SCC-25	human tongue squamous cell carcinoma		2		+	+	12
FaDu	squamous cell carcinoma, pharynx	2	2		+	+	
Colo201	human colorectal adenocarcinoma	2	1		-	+	13
DLD-1	human colorectal adenocarcinoma, Dukes' type C	1	0/1		-	+	14
HCT116	human colorectal carcinoma	1	0/1		-	+	14
HT 29	human colorectal adenocarcinoma;	1	0		+	+	14
SNU-C2B	humancecum colorectal carcinoma	2*			+	+	
SNU-1	human gastric carcinoma	0			-	+	15
SNU-16	human gastric carcinoma	1			-	+	15
NCI-N87	human gastric carcinoma	3	2	1	+	+	15
MDAMB175	human breast ductal carcinoma, ER+	1	1	0/1	+	+	8,16
MDAMB361	human breast adenocarcinoma, ER+, HER2 amp	2/3	1	1	+	+	9,15,17
ZR-75-1	human breast duct epithelial ductal carcinoma, ER+ luminal A	2	1	1	-	+	9
BT-20	human breast carcinoma, Basal A TNBC	0/1	2	1	+	+	18
BT549	human breast ductal carcinoma, Basal B, Mesenchymal-like TNBC, ER-	0	0/1	0	-	+	18
CAMA-1	human breast adenocarcinoma, ER+	2	0	1	-	+	
MDAMB453	human breast metastatic carcinoma, ER-, HER2amp luminal A TNBC	0	0/1	0	-	+	18
T47D	human breast ductal carcinoma, ER+	1	0	1	-	+	19
SK-UT-1	human uterus mesodermal tumor (mixed) grade III				-	+	
TOV-112D	human primary malignant adenocarcinoma; endometrioid carcinoma	2	1	2	+	+	20
A431	human skin epidermoid carcinoma	1	3		-	+	21
Malme-3M	human malignant melanoma, metastatic lung	1	1	1	+	+	9,22
SKMEL28	human malignant melanoma	1	0		-	+	22
Caski	human cervix carcinoma	1			+	+	23
MS751	human cervix epidermoid carcinoma				+	+	
T24	human urinary bladder carcinoma	1	0		-	+	19,21,24
ACHN	human renal cell adenocarcinoma	1	2	0/1	+	+	9,25
CaOV3	human ovary adenocarcinoma	1	1		+	+	26
Ovcar-3	human ovary adenocarcinoma	1/2	2	2	-	+	20,26
SKOV3	human ovary adenocarcinoma	2/3	2	0/1	-	+	

FIG. 38

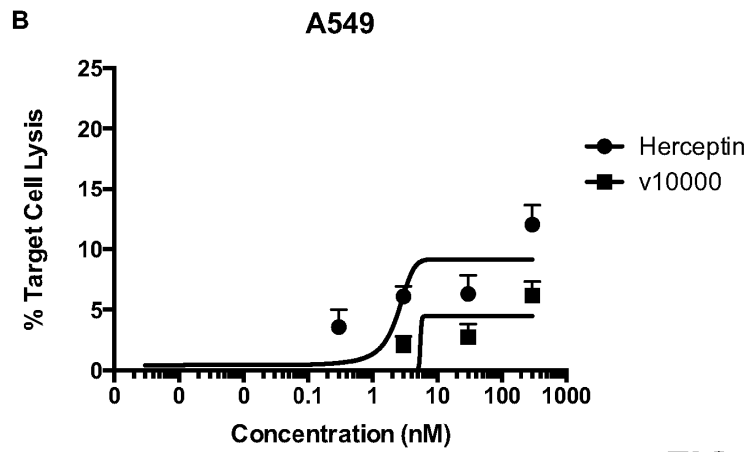
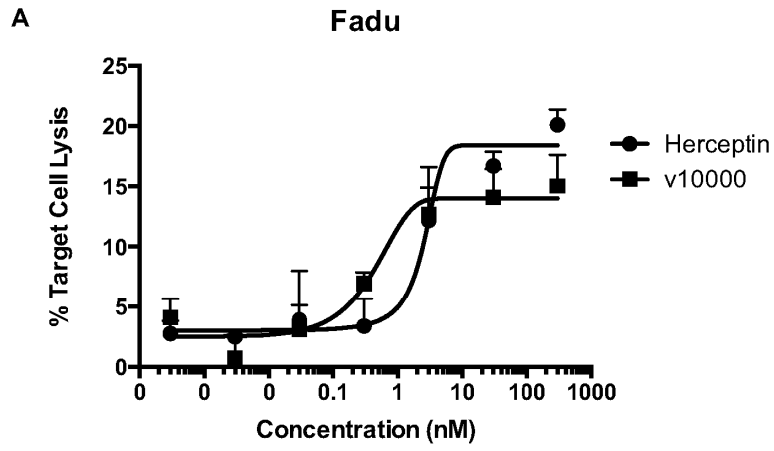


FIG. 39

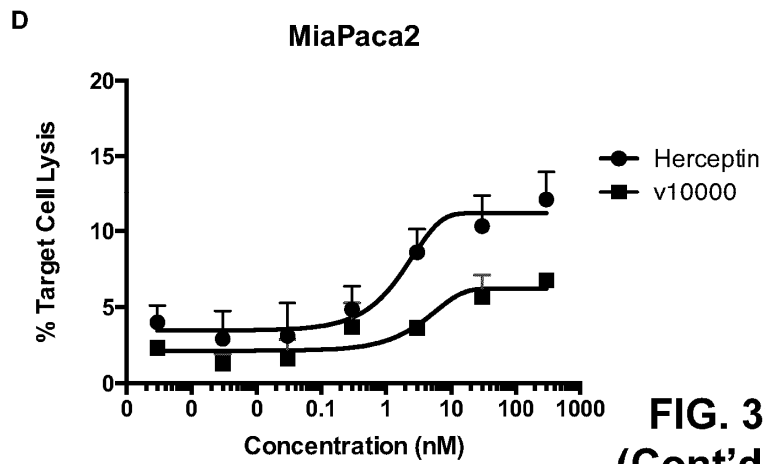
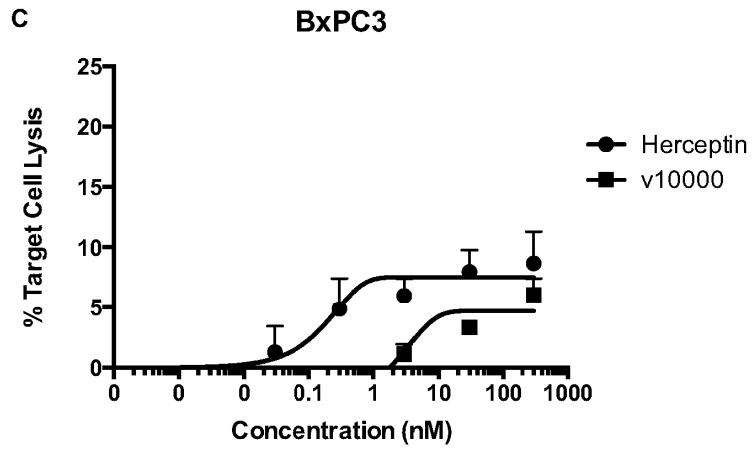


FIG. 39
(Cont'd...)

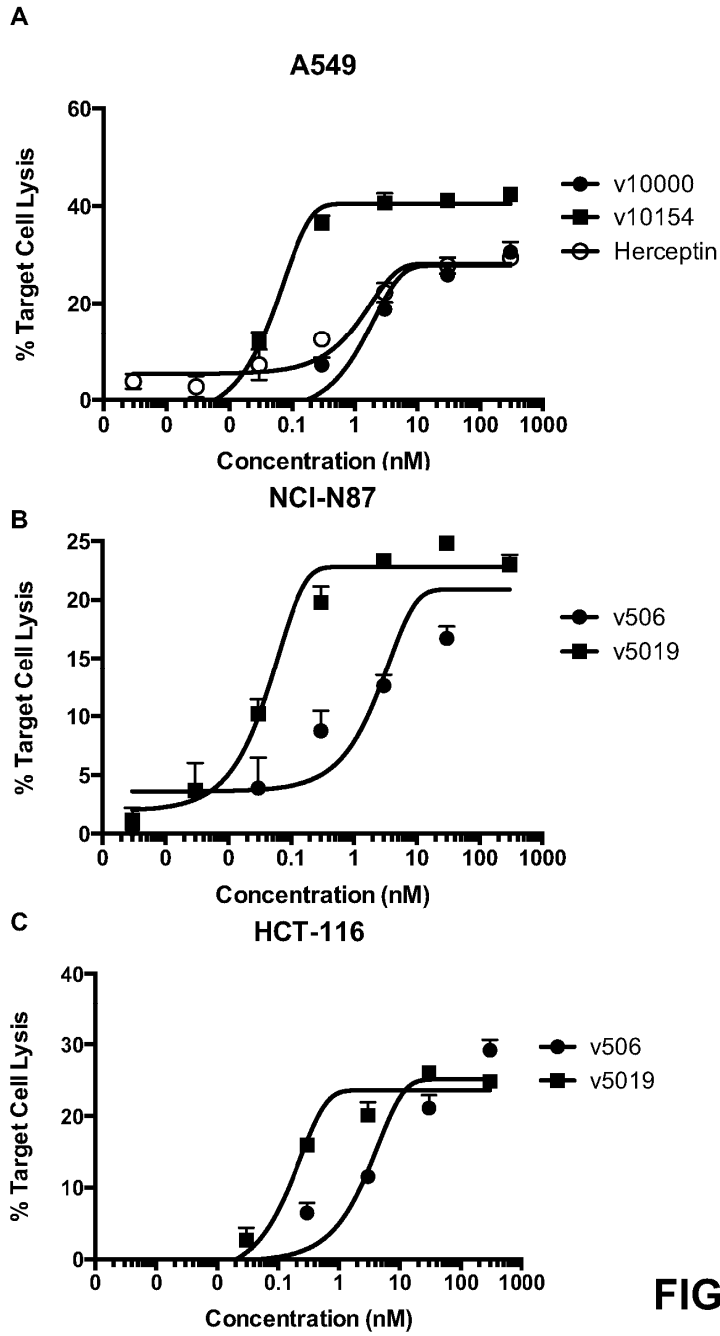


FIG. 40

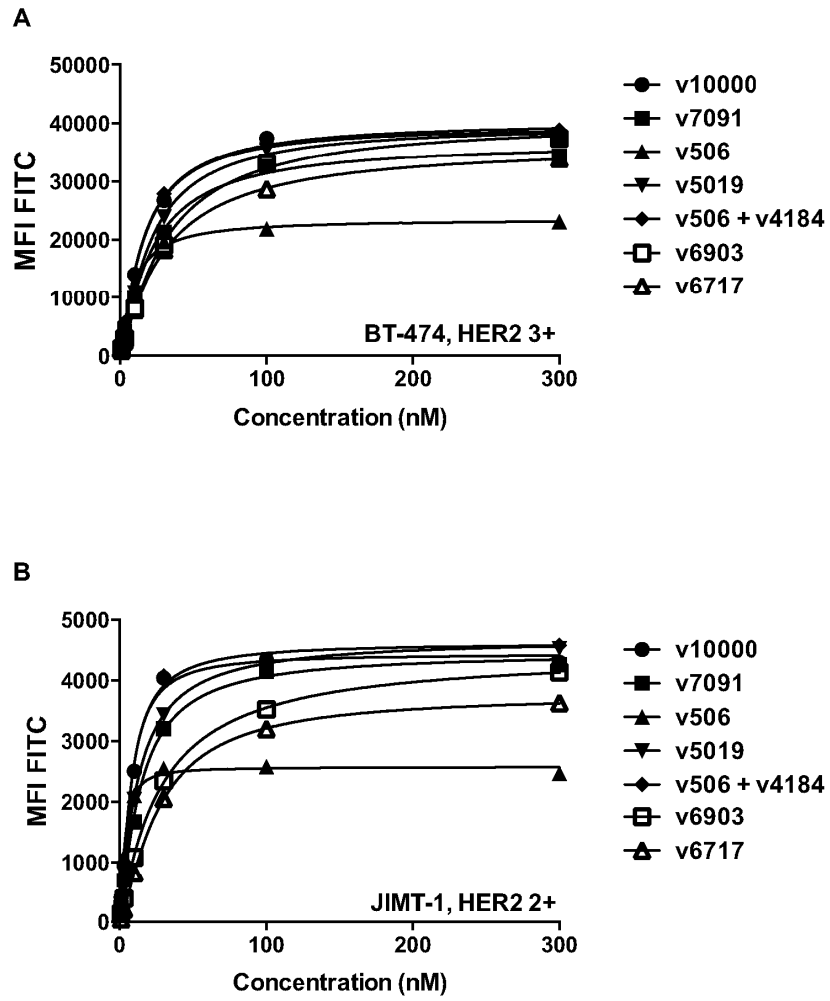


FIG. 41

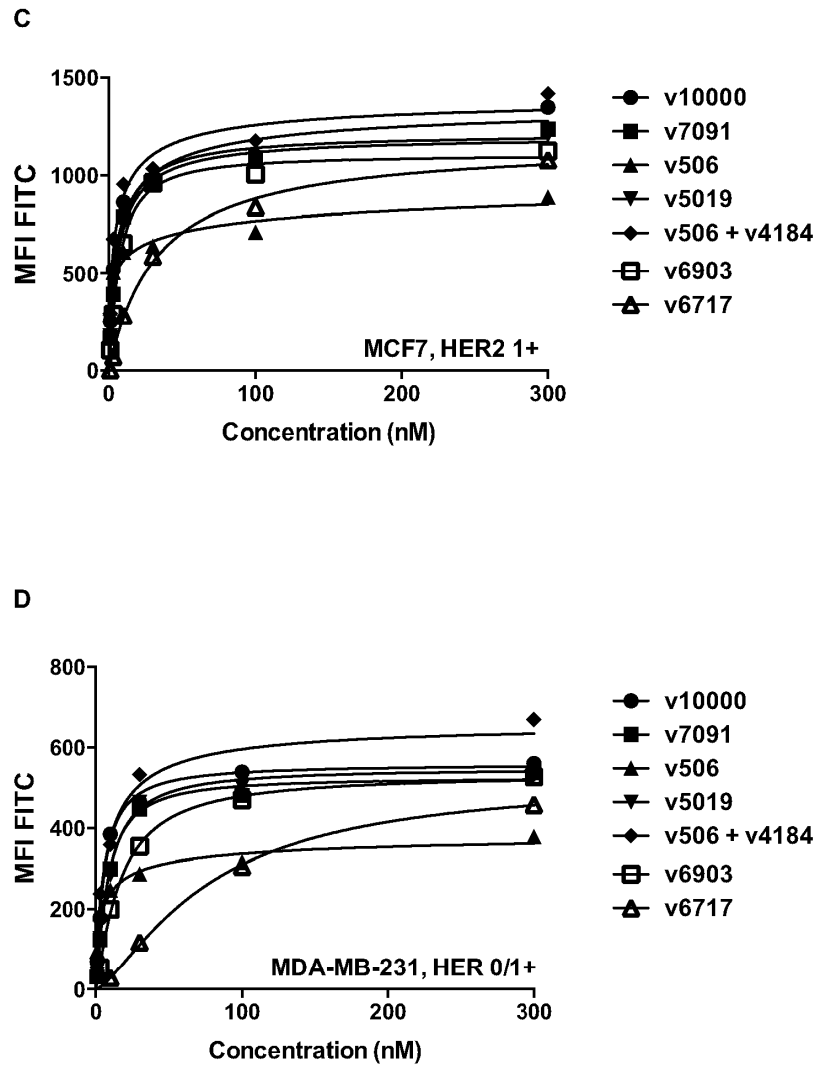


FIG. 41 (Cont'd...)

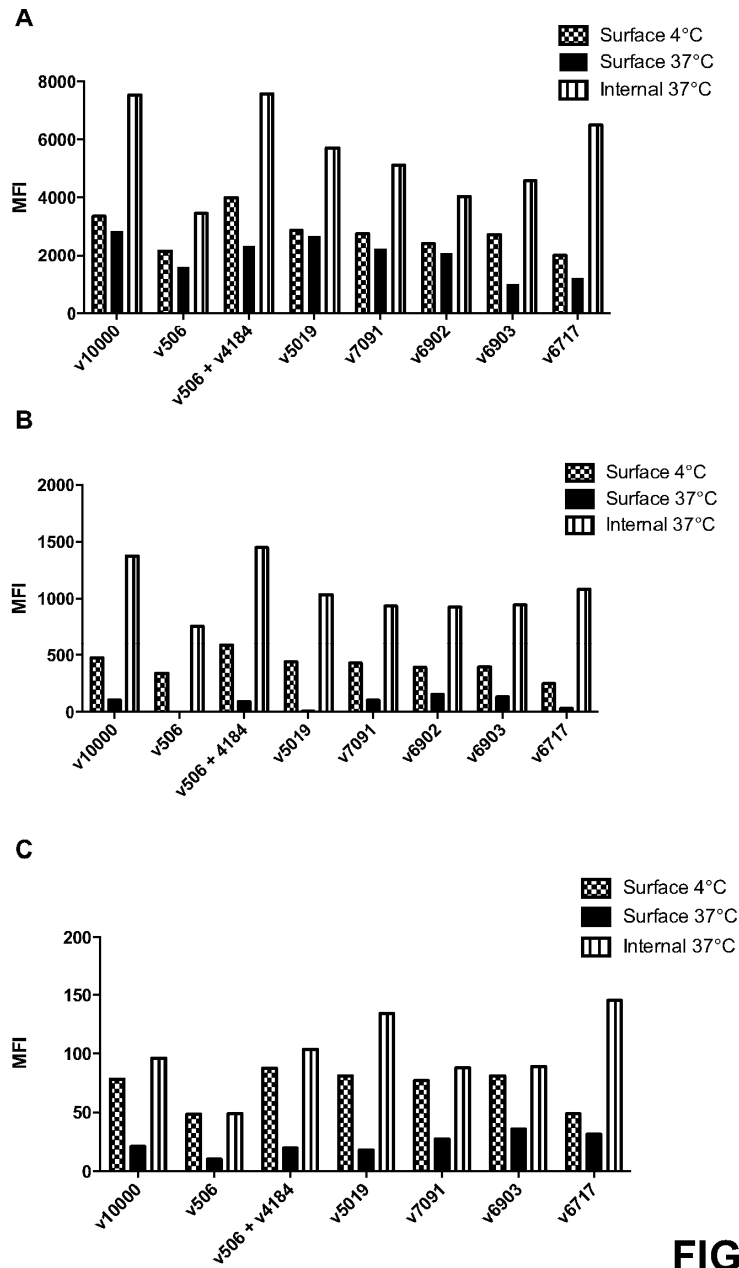


FIG. 42

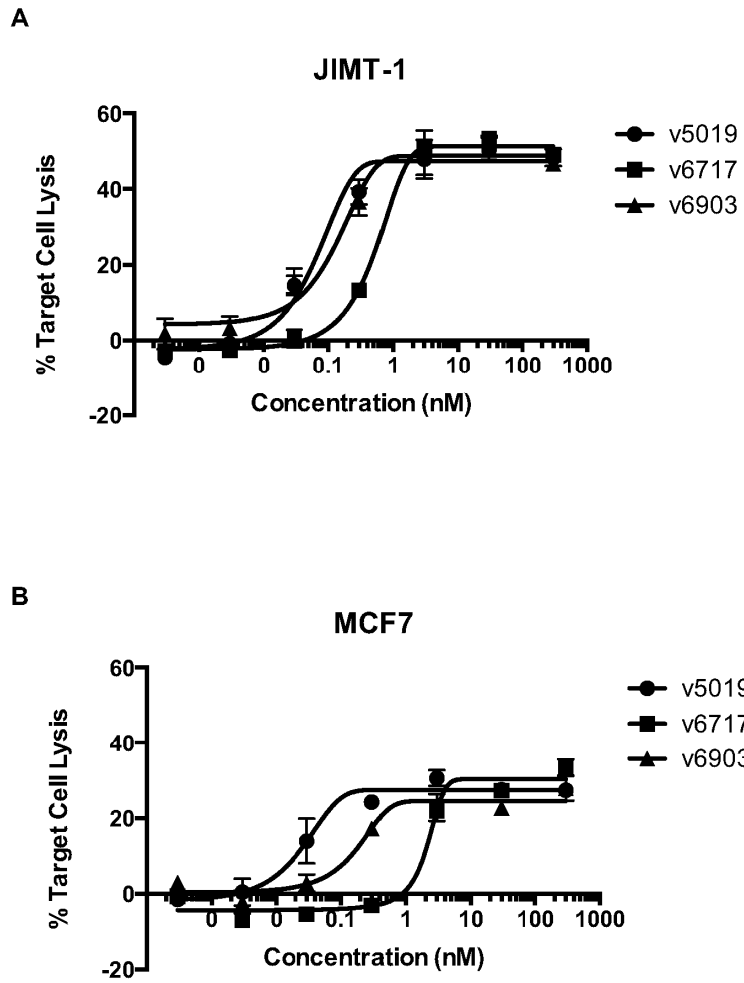


FIG. 43

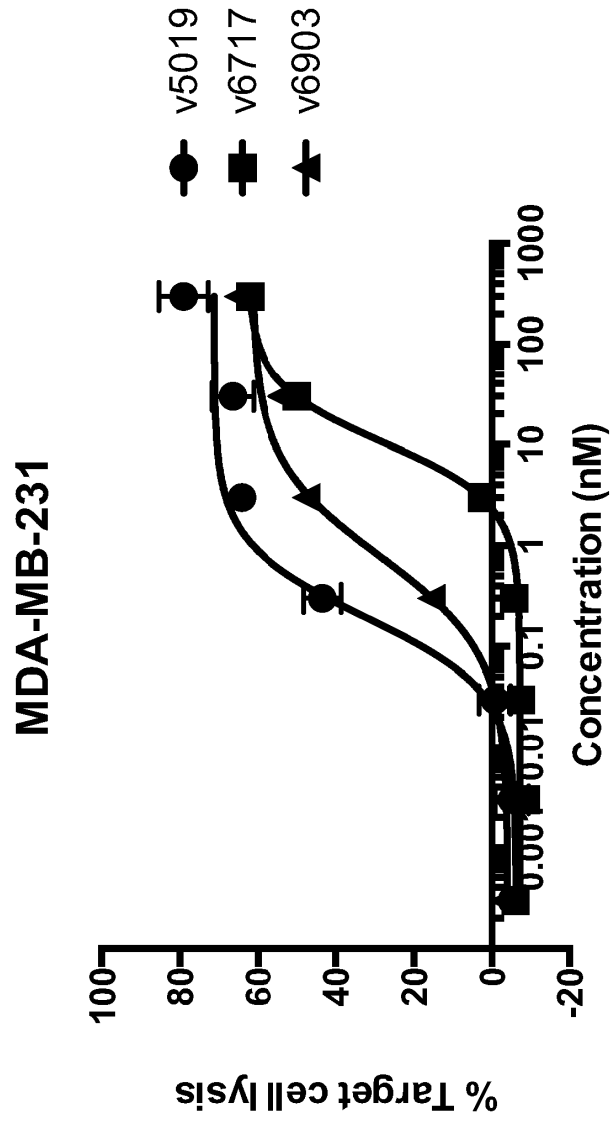


FIG. 43C

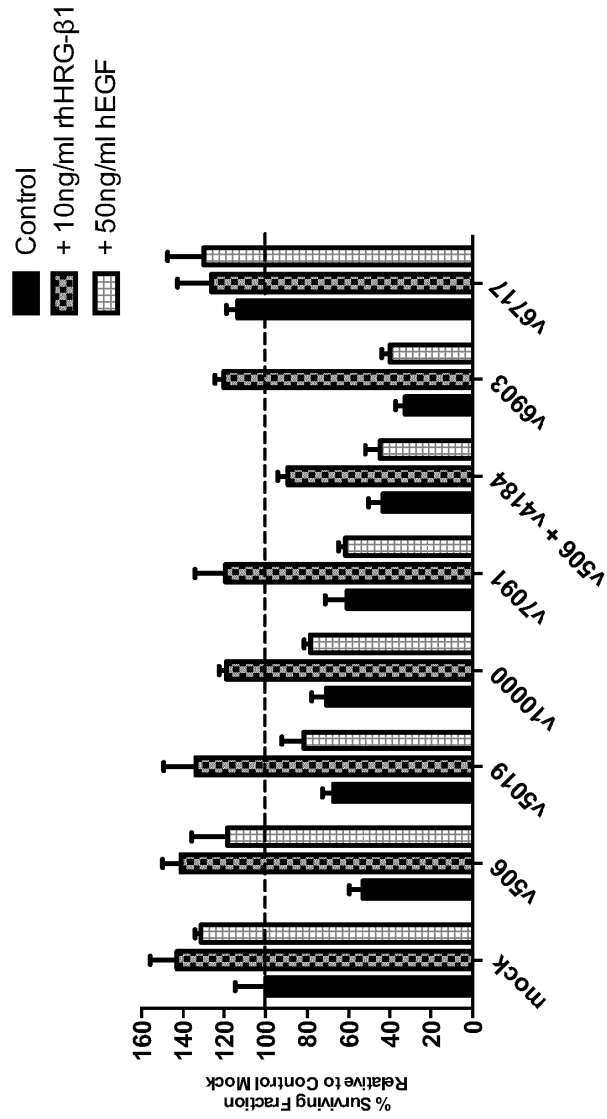


FIG. 44

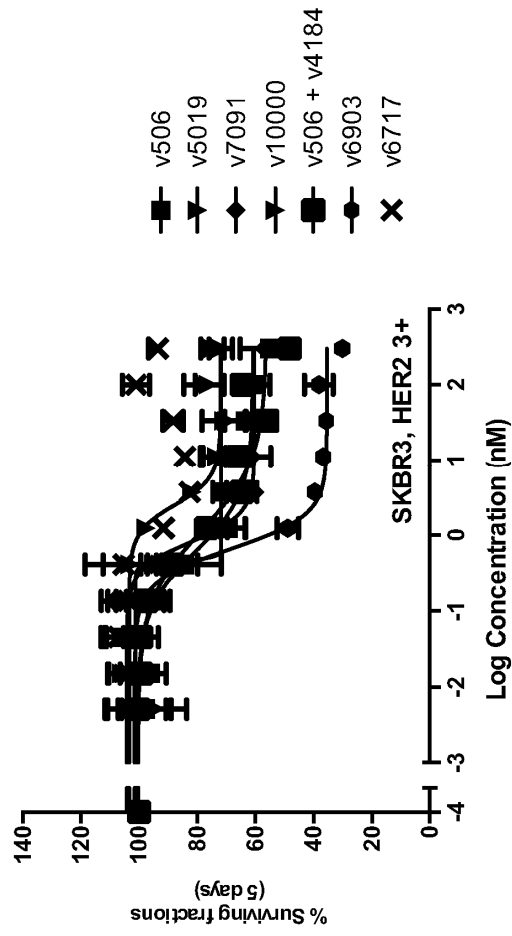
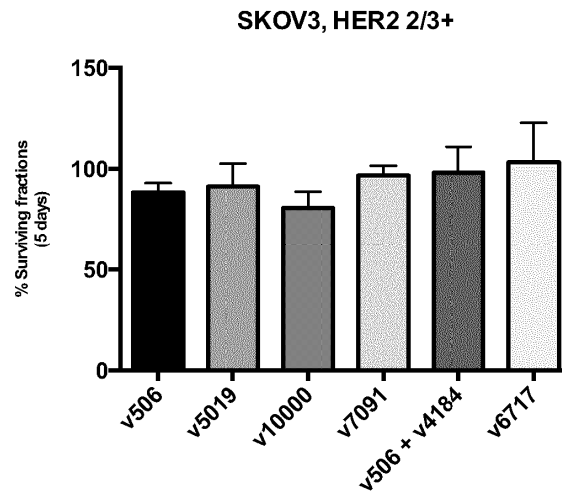


FIG. 45

A



B

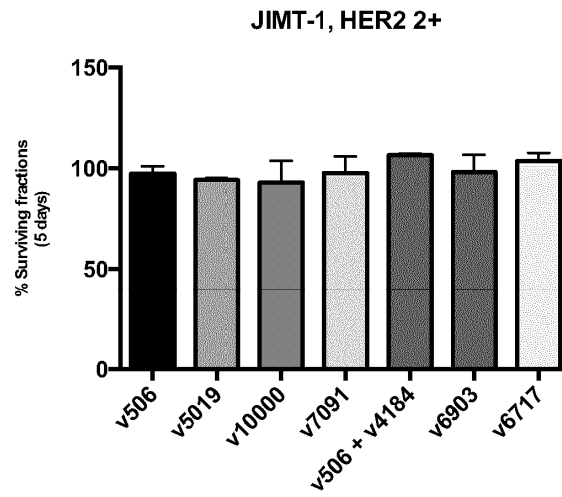


FIG. 46

C

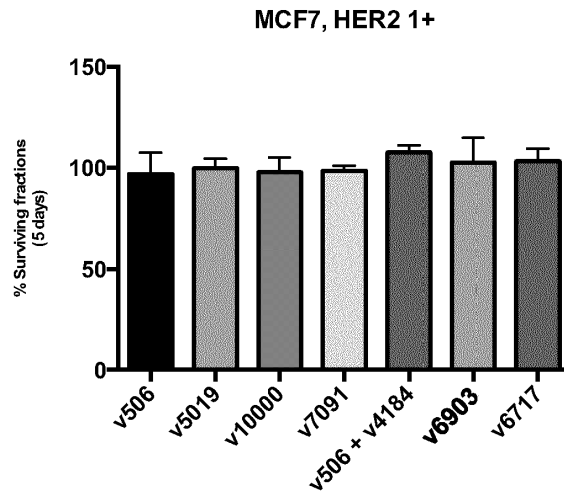
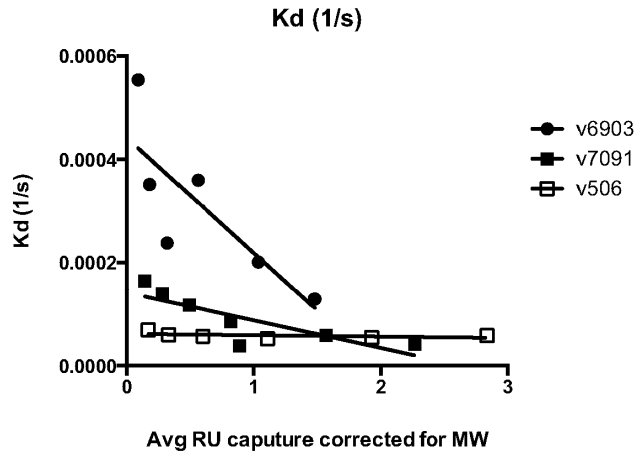


FIG. 46 (Cont'd...)

A



B

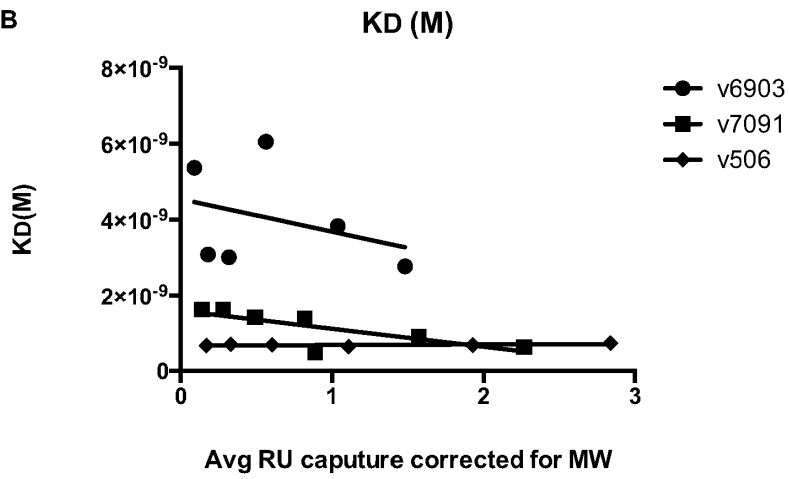


FIG. 47