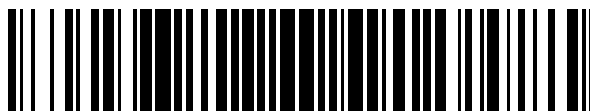


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 911**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05815641 .5**
96 Fecha de presentación: **19.10.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1802344**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **Formulación de anticuerpos en tampón de histidina-acetato**

30 Prioridad:
20.10.2004 US 620413 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA94080-4990, US

72 Inventor/es:
ANDYA, JAMES, D.;
GWEE, SHIANG, C.;
LIU, JUN y
SHEN, YE

74 Agente/Representante:
PONTI SALES, Adelaida

ES 2 389 911 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulación de anticuerpos en tampón de histidina-acetato

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a formulaciones de anticuerpos, que incluyen anticuerpos monoclonales formulados en tampón de histidina-acetato, así como a una formulación que comprende un anticuerpo que se une al dominio II de HER2 (por ejemplo, Pertuzumab).

10

Antecedentes de la invención

[0002] En los últimos diez años, los avances en biotecnología han hecho posible producir una variedad de proteínas para aplicaciones farmacéuticas, usando técnicas de ADN recombinante. Debido a que las proteínas son más grandes y más complejas que los fármacos orgánicos e inorgánicos tradicionales (es decir, tienen múltiples grupos funcionales además de estructuras tridimensionales complejas), la formulación de dichas proteínas plantea problemas especiales. Para que una proteína permanezca biológicamente activa, una formulación debe conservar intacta la integridad conformacional de al menos una secuencia central de los aminoácidos de la proteína, y al mismo tiempo proteger los múltiples grupos funcionales de la proteína frente a la degradación. Las rutas de degradación de las proteínas pueden implicar inestabilidad química (es decir, cualquier procedimiento que implique la modificación de la proteína por formación o escisión de enlaces que de como resultado una nueva entidad química) o inestabilidad física (es decir, cambios en la estructura de orden superior de la proteína). La inestabilidad química puede producir la desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, eliminación beta o intercambio de disulfuro. La inestabilidad física puede producir desnaturalización, agregación, precipitación o adsorción, por ejemplo. Las tres rutas de degradación de proteínas más comunes son la agregación de proteínas, desamidación y oxidación. Cleland y col. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10 (4): 307 – 377 (1993).

15

20

25

Formulaciones de anticuerpos

[0003] Los anticuerpos están incluidos en las proteínas que se usan para aplicaciones farmacéuticas. Un ejemplo de un anticuerpo útil para la terapia es un anticuerpo que se une al antígeno del HER2, tal como Pertuzumab.

30

35

[0004] La patente de EE.UU. nº 6.339.142 describe una composición de anticuerpo contra HER2 que comprende una mezcla de anticuerpo dirigido contra HER2 y una o más variantes ácidas del mismo, en la que la cantidad de la o las variantes ácidas es menor de aproximadamente 25 %. Trastuzumab es un ejemplo de anticuerpo para HER2.

40

45

[0005] Las patentes de EE.UU. nº 6.267.958 y 6.685.940 (Andya y col.) describen formulaciones de anticuerpos liofilizadas, incluyendo formulaciones de anticuerpos IgE y contra HER2. Los documentos WO97/04807 y US 2004/0197326A1 (Fick y col.) describen procedimientos para tratar el asma alérgico con un anticuerpo IgE. El documento WO99/01556 (Lowman y col.) se refiere al anticuerpo IgE con restos de aspartilo propensos a la isomerización, y variantes mejoradas del mismo. El documento US 2002/0045571 (Liu y col.) proporciona formulaciones de proteínas concentradas de viscosidad reducida, ilustradas por formulaciones de anticuerpos IgE humanizados, rhuMAb E25 y E26. Los documentos WO 02/096457 y US 2004/0170623 (Arvinte y col.) describen formulaciones líquidas estables que comprenden el anticuerpo dirigido contra IgE E25. Véase también el documento US 2004/0197324 A1 (Liu y Shire) que se refiere a una formulación dirigida contra IgE de alta concentración.

50

[0006] La patente de EE.UU. nº 6.171.586 (Lam y col.) describe formulaciones acuosas de anticuerpos estables. Se formuló un anticuerpo F (ab')₂ rhuMAb CD18 en tampones de acetato de sodio e histidina-HCl. La formulación preferida para rhuMAb CD18 era acetato de sodio 10 mM, trealosa al 8 %, TWEEN 20™ al 0,01 %, pH 5,0. Las formulaciones en acetato (pH 5,0) de rhuMAb CD20 conservadas a 40 °C durante un mes demostraron una estabilidad mayor que las muestras formuladas en histidina (pH 5,0 o 6,0).

55

[0007] El documento US 2003/0190316 (Kakuta y col.) se refiere al anticuerpo hPM-1 formulado, un anticuerpo del receptor de IL-6 humanizado. La pérdida de monómero mayor era en citrato de sodio (pH 6,7), seguido del fosfato de sodio (pH 6,8), Tris-HCl (pH 7,2), histidina-HCl (pH 7,2) y glicina (pH 7,6) en orden decreciente. Se evaluó el efecto del fosfato-Na (pH 6,5), fosfato-His (pH 6,0 o 6,5), His-HCl (pH 6,5), y fosfato-Na (pH 6,0) en la estabilidad de hPM-1.

60

[0008] El documento WO2004/071439 (Burke y col.) expone que se forman impurezas en una formulación de natalizumab (anticuerpo monoclonal dirigido contra integrina alfa 4 humanizado) por la degradación del polisorbato 80, al parecer por una reacción de oxidación que implica iones metálicos e histidina. Por lo tanto, se seleccionó un tampón de fosfato.

- 5 [0009] El documento WO 2000/066160 (equivalente en lengua inglesa de EP 1 174 148A1) (Okada y col.) se refiere a una formulación de un anticuerpo C4G1 humanizado, que se une a un receptor de fibrinógeno de una glicoproteína de membrana de plaquetas humanas GPIIb/IIIa, en un tampón de fosfato de sodio o citrato de sodio.
- 10 [0010] El documento WO2004/019861 (Johnson y col.) se refiere a CDP870, un fragmento Fab dirigido contra TNF α pegilado, formulado en una concentración de 200 mg/ml en acetato de sodio 50 mM (pH 5,5) y cloruro de sodio 125 mM.
- 15 [0011] El documento WO2004/004639 (Nesta, P.) se refiere a una formulación para huC242-DM1, una inmunotoxina activada por tumor, en un tampón de ácido succínico 50 mM (pH 6,0) y sacarosa (al 5 % en p/v).
- [0012] El documento WO03/039485 (Kaisheva y col.) encontró que Daclizumab (un anticuerpo del receptor de IL-2 humanizado) tiene la estabilidad mayor en tampón de succinato de sodio a pH 6,0, y pierde rápidamente la potencia en histidina cuando lo oxida el tampón.
- 20 [0013] El documento WO 2004/001007 se refiere a un anticuerpo monoclonal CD80 en un tampón de histidina.HCl, acetato de sodio o citrato de sodio.
- [0014] La patente de EE.UU. n° 6.252.055 (Relton, J.) se refiere a anticuerpos dirigidos contra CD4 y CD23 formulados en tampones de maleato, succinato, acetato de sodio o fosfato, identificándose el fosfato como el tampón preferido.
- 25 [0015] La patente de EE.UU. n° 5.608.038 (Eib1 y col.) se refiere a preparaciones de inmunoglobulina policlonal muy concentradas con inmunoglobulina, glucosa o sacarosa y cloruro de sodio en las mismas.
- [0016] El documento WO03/015894 (Oliver y col.) se refiere a una formulación acuosa de SYNAGIS® 100 mg/ml, histidina-HCl 25 mM, glicina 1,6 mM, pH 6,0, y SYNAGIS® liofilizado que cuando se formula (antes de la liofilización) contiene histidina 25 mM, glicina 1,6 M y manitol al 3 % p/v a pH 6,0.
- 30 [0017] El documento US 2004/0191243 A1 (Chen y col.) se refiere a la formulación de ABX-IL8, un anticuerpo IgG2 humano.
- [0018] El documento US 2003/0113316 A1 (Kaisheva y col.) se refiere a una formulación de anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-2 liofilizada.
- 35

Anticuerpos contra HER2

- 40 [0019] La familia HER de receptores tirosina quinasas son mediadores importantes del crecimiento, diferenciación y supervivencia celulares. La familia de receptores incluye cuatro miembros diferentes, incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1 o HER1), HER2 (ErbB2 o p185^{neu}), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).
- 45 [0020] EGFR, codificado por el gen *erbB1*, se ha implicado causalmente en tumores malignos humanos. En particular, se ha observado una mayor expresión de EGFR en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago, así como en glioblastomas. La mayor expresión del receptor EGFR se asocia a menudo con la mayor producción del ligando del EGFR, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), por las mismas células tumorales que producen la activación del receptor por una ruta estimuladora autocrina. Baselga y Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64: 127 – 154 (1994). Se han evaluado los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR o sus ligandos, TGF- α y EGF, como agentes terapéuticos en el tratamiento de dichos tumores malignos. Véase, por ejemplo, Baselga y Mendelsohn., véase antes; Masui y col. *Cancer Research* 44: 1002 – 1007 (1984); y Wu y col. *J. Clin. Invest.* 95: 1897 – 1905 (1995).
- 50 [0021] El segundo miembro de la familia de HER, p185^{neu}, se identificó originalmente como el producto del gen transformante de neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. La forma activada del protooncogén *neu* es resultado de una mutación puntual (de valina a ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. Se observa la amplificación del homólogo humano de *neu* en los cánceres de mama y ovario, y se correlaciona con un pronóstico pobre (Slamon y col., *Science*, 235: 177 – 182 (1987); Slamon y col., *Science*, 244: 707 – 712 (1989); y patente de EE.UU. n° 4.968.603). Hasta la fecha no se ha descrito una mutación puntual análoga a la del protooncogén *neu* en tumores humanos. El exceso de expresión de HER2 (debido con frecuencia, pero no de forma uniforme, a la amplificación de genes) también se ha observado en otros carcinomas incluyendo carcinomas del estómago, endometrio, glándulas salivares, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. Véase, entre otras, King y col., *Science*, 229: 974 (1985); Yokota y col., *Lancet* 1: 765 – 767 (1986); Fukushige y col., *Mol. Cell Biol.*, 6: 955 – 958 (1986); Guerin y col., *Oncogene Res.*, 3: 21 – 31 (1988); Cohen y col., *Oncogene*, 4: 81 – 88
- 55
- 60

(1989); Yonemura y col., *Cancer Res.*, 51: 1034 (1991); Borst y col., *Gynecol. Oncol.*, 38: 364 (1990); Weiner y col., *Cancer Res.*, 50: 421 – 425 (1990); Kern y col., *Cancer Res.*, 50: 5184 (1990); Park y col., *Cancer Res.*, 49: 6605 (1989); Zhou y col., *Mol. Carcinog.*, 3: 254 – 257 (1990); Aasland y col. *Br. J. Cancer* 57: 358 – 363 (1988); Williams y col. *Pathobiology* 59: 46 – 52 (1991); y McCann y col., *Cancer*, 65: 88 – 92 (1990). HER2 puede ser expresado en exceso en el cáncer de próstata (Gu y col. *Cancer Lett.* 99: 185 – 9 (1996); Ross y col., *Hum. Pathol.* 28: 827 – 33 (1997); Ross y col. *Cancer* 79: 2162 – 70 (1997); y Sadasivan y col. *J. Urol.* 150: 126 – 31 (1993)).

[0022] Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos proteínicos p185^{neu} de rata y HER2 humano. Drebin y colaboradores han producido anticuerpos contra el producto del gen *neu* de rata, p185^{neu}. Véase, por ejemplo, Drebin y col., *Cell* 41: 695 – 706 (1985); Myers y col., *Meth. Enzym.* 198: 277 – 290 (1991); y documento WO94/22478, Drebin y col. *Oncogene* 2: 273 – 277 (1988) publican que mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones distintas de p185^{neu} produce efectos antitumorales sinérgicos en células NIH-3T3 transformadas por *neu* en ratones sin pelo. Véase también la patente de EE.UU. 5.824.311 concedida el 20 de octubre, 1998.

[0023] Hudziak y col., *Mol. Cell. Biol.* 9 (3): 1165 – 1172 (1989) describen la generación de un panel de anticuerpos HER2 que se caracterizaron usando la línea celular de tumor de mama humano SK-BR-3. Se determinó la proliferación celular relativa de las células SK-BR-3 después de exposición a los anticuerpos, mediante tinción con cristal violeta de las monocapas después de 72 horas. Mediante este ensayo, se obtuvo la inhibición máxima con el anticuerpo llamado 4D5 que inhibía la proliferación celular en 56 %. Otros anticuerpos del panel reducían la proliferación celular en menor extensión en este ensayo. Se encontró además que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba las líneas celulares de tumor de mama que expresaban en exceso HER2 a los efectos citotóxicos del TNF- α . Véase también, la patente de EE.UU. nº 5.677.171 concedida el 14 de octubre, 1997. Los anticuerpos contra HER2 discutidos por Hudziak y col. son caracterizados adicionalmente por Fendly y col. *Cancer Research* 50: 1550 – 1558 (1990); Kotts y col. *In Vitro* 26 (3): 59A (1990); Sarup y col. *Growth Regulation* 1: 72 – 82 (1991); Shepard y col. *J. Clin. Immunol.* 11 (3): 117 – 127 (1991); Kumar y col. *Mol. Cell. Biol.* 11 (2): 979 – 986 (1991); Lewis y col. *Cancer Immunol. Immunother.* 37: 255 – 263 (1993); Pietras y col. *Oncogene* 9: 1829 – 1838 (1994); Vitetta y col. *Cancer Research* 54: 5301 – 5309 (1994); Sliwkowski y col. *J. Biol. Chem.* 269 (20): 14661 – 14665 (1994); Scott y col. *J. Biol. Chem.* 266: 14300 – 5 (1991); D'souza y col. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7202 – 7206 (1994); Lewis y col. *Cancer Research* 56: 1457 – 1465 (1996); y Schaefer y col. *Oncogene* 15: 1385 – 1394 (1997).

[0024] Una versión humanizada recombinante del anticuerpo contra HER2 murino 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Trastuzumab o HERCEPTIN®; patente de EE.UU. nº 5.821.337) es clínicamente activa en paciente con cánceres de mama metastáticos que expresan en exceso HER2 que han recibido una amplia terapia anticancerígena previa (Baselga y col., *J. Clin. Oncol.* 14: 737 – 744 (1996)). Trastuzumab recibió la aprobación para la comercialización de la Administración de Medicamentos y Alimentos el 25 de septiembre, 1998, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastático cuyos tumores expresaban en exceso la proteína HER2.

[0025] Se han descrito otros anticuerpos contra HER2 con diferentes propiedades en Tagliabue y col. *Int. J. Cancer* 47: 933 – 937 (1991); McKenzie y col. *Oncogene* 4: 543 – 548 (1989); Maier y col. *Cancer Res.* 51: 5361 – 5369 (1991); Bacus y col. *Molecular Carcinogenesis* 3: 350 – 362 (1990); Stancovski y col. *PNAS (USA)* 88: 8691 – 8695 (1991); Bacus y col. *Cancer Research* 52: 2580 – 2589 (1992); Xu y col. *Int. J. Cancer* 53: 401 – 408 (1993); WO94/00136; Kasprzyk y col. *Cancer Research* 52: 2771 – 2776 (1992); Hancock y col. *Cancer Res.* 51: 4575 – 4580 (1991); Shawver y col. *Cancer Res.* 54: 1367 – 1373 (1994); Arteaga y col. *Cancer Res.* 54: 3758 – 3765 (1994); Harwerth y col. *J. Biol. Chem.* 267: 15160 – 15167 (1992); patente de EE.UU. nº 5.783.186; y Klapper y col. *Oncogene* 14: 2099 – 2109 (1997).

[0026] La selección por homología ha dado como resultado la identificación de otros dos miembros de la familia de receptores HER; HER3 (patentes de EE.UU. nº 5.183.884 y 5.480.968 así como Kraus y col. *PNAS (USA)* 86: 9193 – 9197 (1989)) y HER4 (solicitud de patente EP 599.274; Plowman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1746 – 1750 (1993); y Plowman y col., *Nature*, 366: 473 – 475 (1993)). Ambos receptores presentan una mayor expresión en al menos algunas líneas celulares de cáncer de mama.

[0027] Los receptores HER en general se encuentran en diferentes combinaciones en las células y se cree que la heterodimerización aumenta la diversidad de respuestas celulares a una variedad de ligandos de HER (Earp y col. *Breast Cancer Research and Treatment* 35: 115 – 132 (1995)). El EGFR se une a 6 ligandos diferentes; factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), factor de crecimiento epidérmico que se une a heparina, anfíregulina (HB-EGF), betacelulina y epiregulina (Groenen y col. *Growth Factors* 11: 235 – 257 (1994)). Una familia de proteínas heregulinas que resultan del corte y empalme alternativo de un solo gen, son los ligandos para HER3 y HER4. La familia de heregulinas incluye heregulinas alfa, beta y gamma (Holmes y col., *Science*, 256: 1205 – 1210 (1992); patente de EE.UU. nº 5.641.869; y Schaefer y col. *Oncogene* 15: 1385 – 1394 (1997)); factores de diferenciación de neu (NDF), factores de crecimiento glial (GGF); inductor de la actividad del receptor de acetilcolina (ARIA); y factor derivado de neuronas motoras y sensoriales (SMDF). Para una revisión véase Groenen y col. *Growth Factors* 11: 235 – 257 (1994); Lernke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7: 247 – 262 (1996) y Lee y col. *Pharm. Rev.* 47: 51 – 85 (1995). Recientemente, se han identificado 3 ligandos de HER adicionales; la

neuregulina-2 (NRG-2) que se describe que se une a HER3 o HER4 (Chang y col. *Nature* 387 509 – 512 (1997); y Carraway y col. *Nature* 387: 512 – 516 (1997)); la neuregulina-3 que se une a HER4 (Zhang y col. *PNAS* (USA) 94 (18): 9562 – 7 (1997)); y la neuregulina-4 que se une a HER4 (Harari y col. *Oncogene* 18: 2681 – 89 (1999)), HB-EGF, betacelulina y epiregulina también se unen a HER4.

[0028] Mientras que el EGF y el TGF α no se unen a HER2, el EGF estimula que el EGFR y HER2 formen un heterodímero, que activa el EGFR y produce la transforilación de HER2 en el heterodímero. Parece que la dimerización y/o transforilación activan la HER2 tirosina quinasa. Véase Earp y col., véase antes. Igualmente, cuando HER3 es expresado conjuntamente con HER2, se forma un complejo de señalización activo y los anticuerpos dirigidos contra HER2 son capaces de alterar este complejo (Sliwkowski y col., *J. Biol. Chem.*, 269 (20): 14661 – 14665 (1994)). Además, la afinidad del HER3 por la heregulina (HRG) aumenta a un estado de afinidad mayor cuando es expresado conjuntamente con HER2. Véase también, Levi y col., *Journal of Neuroscience* 15: 1329 – 1340 (1995); Morrissey y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431 – 1435 (1995); y Lewis y col., *Cancer Res.*, 56: 1457 – 1465 (1996) con respecto al complejo de proteínas HER2-HER3. HER4, como HER3, forma un complejo de señalización activo con HER2 (Carraway y Cantley, *Cell* 78: 5 – 8 (1994)).

[0029] Para dirigirse a la ruta de señalización de HER, se desarrolló rhuMAb 2C4 (Pertuzumab, OMNITARG™) como un anticuerpo humanizado que inhibe la dimerización de HER2 con otros receptores HER, inhibiendo así la fosforilación y activación dirigidas por ligando, y la activación corriente abajo de las rutas de RAS y AKT. En un ensayo en fase I de Pertuzumab como un solo agente para tratar tumores sólidos, 3 sujetos con cáncer de ovario avanzado se trataron con Pertuzumab. Uno tuvo una respuesta parcial duradera, y un sujeto adicional tuvo la enfermedad estable durante 15 semanas. Agus y col. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22: 192, Abstract 771 (2003).

Anticuerpos DR5

[0030] En la técnica se han identificado diferentes ligandos y receptores que pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Entre dichos ligandos están incluidos el factor de necrosis tumoral alfa ("TNF-alfa"), factor de necrosis tumoral beta ("TNF-beta" o "linfotóxina-alfa"), linfotóxina-beta ("LT-beta"), ligando CD30, ligando CD27, ligando CD40, ligando OX-40, ligando 4-1BB, LIGHT, ligando Apo-1 (también denominado ligando Fas o ligando CD95), ligando Apo-2 (también denominado Apo2L o TRAIL), ligando Apo-3 (también denominado TWEAK), APRIL, ligando OPG (también denominado ligando RANK, ODF, o TRANCE), y TALL-1 (también denominado BlyS, BAFF o THANK) (Véase, p. ej., Ashkenazi, *Nature Review*, 2: 420 – 430 (2002); Ashkenazi y Dixit, *Science*, 281: 1305 – 1308 (1998); Ashkenazi y Dixit, *Curr. Opin Cell Biol.*, 11: 255 – 260 (2000); Golstein, *Curr. Biol.*, 7: 750 – 753 (1997) Wallach, *Cytokine Preference*, Academic Press, 2000, páginas 377 – 411; Locksley y col., *Cell*, 104: 487 – 501 (2001); Gruss y Dower, *Blood*, 85: 3378 – 3404 (1995); Schmid y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 1881 (1986); Dealtry y col., *Eur. J. Immunol.*, 17: 689 (1987); Pitti y col., *J. Biol. Chem.*, 271: 12687 – 12690 (1996); Wiley y col., *Immunity*, 3: 673 – 682 (1995); Browning y col., *Cell*, 72: 847 – 856 (1993); Armitage y col. *Nature*, 357: 80 – 82 (1992), documentos WO 97/01633 publicado el 16 de enero, 1997; WO 97/25428 publicado el 17 de julio, 1997; Marsters y col., *Curr. Biol.*, 8: 525 – 528 (1998); Chicheportiche y col., *Biol. Chem.*, 272: 32401 – 32410 (1997); Hahne y col., *J. Exp. Med.*, 188: 1185 – 1190 (1998); documentos WO 98/28426 publicado el 2 de julio, 1998; WO 98/46751 publicado el 22 de octubre, 1998; WO/98/18921 publicado el 7 de mayo, 1998; Moore y col., *Science*, 285: 260 – 263 (1999); Shu y col., *J. Leukocyte Biol.*, 65: 680 (1999); Schneider y col., *J. Exp. Med.*, 189: 1747 – 1756 (1999); Mukhopadhyay y col., *J. Biol. Chem.*, 274: 15978 – 15981 (1999)).

[0031] La inducción de diferentes respuestas celulares mediadas por dichos ligandos de la familia del TNF típicamente es iniciada por su unión a receptores celulares específicos. Algunos, pero no todos, los ligandos de la familia del TNF se unen, y a través de esto inducen diferentes actividades biológicas, a "receptores de muerte" de superficie celular para activar caspasas o enzimas que llevan a cabo la ruta de la muerte celular o apoptosis (Salvesen y col., *Cell*, 91: 443 – 446 (1997)). Entre los miembros de la superfamilia de receptores de TNF identificados hasta la fecha, están incluidos TNFR1, TNFR2, TACI, GITR, CD27, OX-40, CD30, CD40, HVEM, Fas (también denominado Apo-1 o CD95), DR4 (también denominado TRAIL-R1), DR5 (también denominado Apo-2 o TRAIL-R2), DcR1, DcR2, osteoprotegerina (OPG), RANK y Apo-3 (también denominado DR3 o TRAMP).

[0032] La mayoría de estos miembros de la familia de receptores de TNF comparten la estructura típica de los receptores de superficie celular, incluyendo las regiones extracelular, transmembrana e intracelular, mientras que otros se encuentran de forma natural como proteínas solubles que carecen de un dominio transmembrana e intracelular. La parte extracelular de los TNFR típicos contiene un patrón de secuencia de aminoácidos repetitivo de múltiples dominios ricos en cisteína (CRD), que empiezan en el extremo NH₂.

[0033] El ligando denominado Apo-2L o TRAIL se identificó hace algunos años como un miembro de la familia de citoquinas TNF (véase, p. ej., Wiley y col., *Immunity*, 3: 673 – 682 (1995); Pitti y col., *J. Biol. Chem.*, 271: 12697 – 12690 (1996); documentos WO 97/01633; WO 97/25428; patente de EE.UU. n.º 5.763.223 concedida el 9 de junio, 1998; patente de EE.UU. n.º 6.284.236 concedida el 4 de septiembre, 2001). La secuencia natural de longitud completa del polipéptido Apo2L/TRAIL humano es una proteína de transmembrana de tipo II, de 281 aminoácidos de

longitud. Algunas células pueden producir una forma natural soluble del polipéptido, por escisión enzimática de la región extracelular del polipéptido (Mariani y col., *J. Cell. Biol.*, 137: 221 – 229 (1997)). Los estudios cristalográficos de las formas solubles de Apo2L/ TRAIL ponen de manifiesto una estructura homotrímica similar a las estructuras del TNF y otras proteínas relacionadas (Hymowitz y col., *Molec. Cell*, 4: 563 – 571 (1999); Cha y col., *Immunity*, 11: 253 – 261 (1999); Mongkolsapaya y col., *Nature Structural Biology*, 6: 1048 (1999); Hymowitz y col., *Biochemistry*, 39: 633 – 644 (2000)). Sin embargo, se encontró que Apo2L/TRAIL, a diferencia de otros miembros de la familia de TNF, tenía una característica estructural única en cuanto que 3 restos de cisteína (en la posición 230 de cada subunidad en el homotrímero) juntos se coordinan con un átomo de cinc, y que la unión del cinc es importante para la estabilidad del trímero y la actividad biológica. (Hymowitz y col., véase antes; Bodmer y col., *J. Biol. Chem.*, 275: 20632 – 20637 (2000)).

[0034] Se ha descrito en la bibliografía que Apo2L/TRAIL puede tener una función en la modulación del sistema inmunitario, incluyendo las enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide (véase, p. ej., Thomas y col., *J. Immunol.*, 161: 2195 – 2200 (1998); Johnsen y col., *Cytokine*, 11: 664 – 672 (1999); Griffith y col., *J. Exp. Med.*, 189: 1343 – 1353 (1999); Song y col., *J. Exp. Med.*, 191: 1095 – 1103 (2000)).

[0035] También se ha descrito que las formas solubles de Apo2L/TRAIL inducen la apoptosis en una variedad de células cancerosas, incluyendo tumores de colon, pulmón, mama, próstata, vejiga, riñón, ovario y cerebro, así como melanoma, leucemia y mieloma múltiple (véase, p. ej., Wiley y col., véase antes; Pitti y col., véase antes; patente de EE.UU. 6.030.945 concedida el 29 de febrero, 2000; patente de EE.UU. 6,746,668 concedida el 8 de junio, 2004; Rieger y col., *FEBS Letters*, 427: 124 – 128 (1998); Ashkenazi y col., *J. Clin. Invest.*, 104: 155 – 162 (1999); Walczak y col., *Nature Med.*, 5: 157 – 163 (1999); Keane y col., *Cancer Research*, 59: 734 – 741 (1999); Mizutani y col., *Clin. Cancer Res.*, 5: 2605 – 2612 (1999); Gazitt, *Leukemia*, 13: 1817 – 1824 (1999); Yu y col., *Cancer Res.*, 60: 2384 – 2389 (2000); Chinnaiyan y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 1754 – 1759 (2000)). Los estudios in vivo en modelos de tumores murinos sugieren además que Apo2L/TRAIL, solo o en combinación con quimioterapia o terapia de radiación, pueden ejercer efectos antitumorales sustanciales (véase, p. ej., Ashkenazi y col., véase antes; Walczak y col., véase antes; Gliniak y col., *Cancer Res.*, 59: 6153 – 6158 (1999); Chinnaiyan y col., véase antes; Roth y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 265: 1999 (1999); solicitud PCT US/00/15512; solicitud PCT US/01/23691). A diferencia de muchos tipos de células cancerosas, la mayoría de las células humanas normales parece que son resistentes a la inducción de la apoptosis por algunas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi y col., véase antes; Walczak y col., véase antes). Jo y col. han descrito que una forma soluble marcada con polihistidina de Apo2L/TRAIL inducía la apoptosis in vitro en hepatocitos humanos normales aislados, pero no en los no humanos (Jo y col., *Nature Med.*, 6: 564 – 567 (2000); véase también, Nagata, *Nature Med.*, 6: 502 – 503 (2000)). Se cree que algunas preparaciones de Apo2L/TRAIL recombinantes pueden variar en términos de propiedades bioquímicas y actividades biológicas en células normales frente a enfermas, dependiendo, por ejemplo, de la presencia o ausencia de una molécula marcadora, el contenido de cinc, y el contenido en % de trímero (véase, Lawrence y col., *Nature Med.*, Carta al Editor, 7: 383 – 385 (2001); Qin y col., *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7: 385 – 386 (2001)).

[0036] Se ha encontrado que Apo2L/TRAIL une al menos 5 receptores diferentes. Al menos dos de los receptores que se unen a Apo2L/TRAIL contienen un dominio de muerte citoplasmático funcional. Uno de dichos receptores se ha denominado "DR4" (y alternativamente TR4 o TRAIL-R1) (Pan y col., *Science*, 276: 111 – 113 (1997); véase también el documento WO 98/32856 publicado el 30 de julio, 1998; documento WO 99/37684 publicado el 29 de julio, 1999; documento WO 00/73349 publicado el 7 de diciembre, 2000; documento US 6.433.147 concedido el 13 de agosto, 2002; documento US 6.461.823 concedido el 8 de octubre, 2002, y documento US 6.342.383 concedido el 29 de enero, 2002).

[0037] Otro de dichos receptores para Apo2L/TRAIL se ha denominado DR5 (también se ha denominado alternativamente Apo-2; TRAIL-R o TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER) (véase, p. ej., Sheridan y col., *Science*, 277: 818 – 821 (1997); Pan y col., *Science*, 277: 815 – 818 (1997), documentos WO98/51793 publicado el 19 de noviembre, 1998; WO98/41629 publicado el 24 de septiembre, 1998; Screation y col., *Curr. Biol.*, 7: 693 – 696 (1997); Walczak y col., *EMBO J.*, 16: 5386 – 5387 (1997); Wu y col., *Nature Genetics*, 17: 141 – 143 (1997); documentos WO98/35986 publicado el 20 de agosto, 1998; EP870827 publicado el 14 de octubre, 1998; WO98/46643 publicado el 22 de octubre, 1998; WO99/02653 publicado el 21 de enero, 1999; WO99/09165 publicado el 25 de febrero, 1999; WO99/11791 publicado el 11 de marzo, 1999; US 2002/0072091 publicado el 13 de agosto, 2002; US 2002/0098550 publicado el 7 de diciembre, 2001; US 6.313.269 concedido el 6 de diciembre, 2001; US 2001/0010924 publicado el 2 de agosto, 2001; US 2003/01255540 publicado el 3 de julio, 2003; US 2002/0160446 publicado el 31 de octubre, 2002, US 2002/0048785 publicado el 25 de abril, 2002; US 6.342.369 concedido en febrero, 2002; US 6.569.642 concedido el 27 de mayo, 2003, US 6.072.047 concedido el 6 de junio, 2000, US 6.642.358 concedido el 4 de noviembre, 2003; US 6.743.625 concedido el 1 de junio, 2004). Como DR4, se ha descrito que DR5 contiene un dominio citoplasmático de muerte y es capaz de señalización de apoptosis tras la unión del ligando (o tras la unión de una molécula, tal como un anticuerpo agonista que mimetiza la actividad del ligando). La estructura cristalina del complejo formado entre Apo-2L/TRAIL y DR5 se describe en Hymowitz y col., *Molecular Cell*, 4: 563 – 571 (1999).

[0038] Tras la unión del ligando, tanto DR4 como DR5 pueden producir la apoptosis independientemente por reclutamiento y activación del iniciador de la apoptosis, la caspasa-8, por la molécula adaptadora que contiene el dominio de muerte denominado FADD/Mort1 (Kischkel y col., *Immunity*, 12: 611 – 620 (2000); Sprick y col., *Immunity*, 12: 599 – 609 (2000); Bodmer y col., *Nature Cell Biol.*, 2: 241 – 243 (2000)).

[0039] Se ha descrito que Apo2L/TRAIL también se une a los receptores denominados DcR1, DcR2 y OPG, que se cree que funcionan como inhibidores, más que transductores de la señalización (véase, p. ej., DcR1 (también denominado TRID, LIT o TRAIL-R3) (Pan y col., *Science*, 276: 111 – 113 (1997); Sheridan y col. *Science*, 277: 818 – 821 (1997); McFarlane y col., *J. Biol. Chem.*, 272: 25417 – 25420 (1997); Schneider y col., *FEBS Letters*, 416: 329 – 334 (1997); Degli-Esposti y col., *J. Exp. Med.*, 186: 1165 – 1170 (1997); y Mongkolsapaya y col., *J. Immunol.*, 160: 3 – 6 (1998)); DcR2 (también llamado TRUNDD o TRAIL-R4) (Marsters y col., *Curr. Biol.*, 7: 1003 – 1006 (1997); Pan y col., *FEBS Letters*, 424: 41 – 45 (1998); Degli-Esposti y col., *Immunity*, 7: 813 – 820 (1997)), y OPG. A diferencia de DR4 y DR5, los receptores DcR1 y DcR2 no señalizan apoptosis.

[0040] En la bibliografía se han descrito algunos anticuerpos que se unen a los receptores DR4 y/o DR5. Por ejemplo, se describen anticuerpos dirigidos contra DR4, dirigidos contra el receptor DR4 y que tienen actividad agonista o apoptótica en determinadas células de mamífero, p. ej., en los documentos WO 99/37684 publicado el 29 de julio, 1999; WO 00/73349 publicado el 12 de julio, 2000; WO 03/066661 publicado el 14 de agosto, 2003. Véase también, p. ej., Griffith y col., *J. Immunol.*, 162: 2597 – 2605 (1999); Chuntharapai y col., *J. Immunol.*, 166: 4891 – 4898 (2001); documentos WO 02/097033 publicado el 2 de diciembre, 2002; documento WO 03/042367 publicado el 22 de mayo, 2003; WO 03/038043 publicado el 8 de mayo, 2003; WO 03/037913 publicado el 8 de mayo, 2003. También se han descrito algunos anticuerpos dirigidos contra DR5, véase, p. ej., el documento WO 98/51793 publicado el 8 de noviembre, 1998; Griffith y col., *J. Immunol.*, 162: 2597 – 2605 (1999); Ichikawa y col., *Nature Med.*, 7: 954 – 960 (2001); Hylander y col., "An Antibody to DR5 (TRAIL-Receptor 2) Suppresses the Growth of Patient Derived Gastrointestinal Tumors Grown in SCID mice", Abstract, 2º Congreso Internacional sobre Anticuerpos Monoclonales en el Cáncer, 29 de agosto – 1 de septiembre, 2002, Banff, Alberta, Canadá; documentos WO 03/038043 publicado el 8 de mayo, 2003; WO 03/037913 publicado el 8 de mayo, 2003. Además, se han descrito algunos anticuerpos que tienen reactividad cruzada tanto con los receptores DR4 como DR5 (véase, p. ej., la patente de EE.UU. 6.252.050 concedida el 26 de junio, 2001).

Resumen de la invención

[0041] La invención del presente documento se refiere, al menos en parte, a la identificación de la histidina-acetato, pH de 5,5 a 6,5 como un tampón particularmente útil para formular anticuerpos monoclonales, en especial anticuerpos IgG1 de longitud completa, que son susceptibles de desamidación y/o agregación. La formulación retarda la degradación del producto anticuerpo de la misma.

[0042] Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a una formulación farmacéutica estable como se define en la reivindicación 1.

[0043] En el presente documento se describe una formulación farmacéutica que comprende: (a) un anticuerpo IgG1 de longitud completa susceptible de desamidación y agregación en una cantidad de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml; (b) tampón de histidina-acetato, pH de 5,5, a 6,5; (c) sacárido seleccionado del grupo que consiste en trealosa y sacarosa, en una cantidad de aproximadamente 60 mM a aproximadamente 250 mM; y (d) polisorbato 20 en una cantidad de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,1 %.

[0044] En el presente documento se describe un método para reducir la desamidación y la agregación de un anticuerpo monoclonal terapéutico, que comprende formular el anticuerpo en un tampón de histidina-acetato, pH de 5,5, a 6,5.

[0045] En el presente documento se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une al dominio II del HER2 en un tampón de histidina a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, un sacárido y un tensioactivo.

[0046] La invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende Pertuzumab en una cantidad de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml, tampón de histidina-acetato, sacarosa y polisorbato 20, en la que el pH de la formulación es de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5.

[0047] En el presente documento se describe un vial con un tapón perforable mediante una jeringa o un depósito de acero inoxidable que comprende la formulación dentro del vial o depósito, opcionalmente en forma congelada.

[0048] En el presente documento se describe un procedimiento para hacer una formulación farmacéutica que comprende: (a) preparar la formulación de anticuerpo monoclonal; y (b) evaluar la estabilidad física, estabilidad química o actividad biológica del anticuerpo monoclonal en la formulación.

Breve descripción de los dibujos**[0049]**

- 5 La figura 1 representa los dominios I – IV (SEQ ID No. 19 – 22, respectivamente) del dominio extracelular del HER2.
- Las figuras 2A y 2B representan alineamientos de secuencias de aminoácidos de los dominios ligero variable (V_L) (Fig. 2A) y pesado variable (V_H) (Fig. 2B) del anticuerpo monoclonal murino 2C4 (SEQ ID Nos. 1 y 2, respectivamente); dominios de V_L y V_H de 2C4 humanizado versión 574 (SEQ ID Nos. 3 y 4, respectivamente) y regiones armazón consenso V_L y V_H humanas (hum κ 1, subgrupo de cadena ligera kappa I; humIII, subgrupo de cadena pesada III) (SEQ ID Nos. 5 y 6, respectivamente). Los asteriscos identifican diferencias entre el anticuerpo monoclonal murino 2C4 y la versión humanizada de 2C4 574, o entre la versión humanizada de 2C4 574 y la región armazón humana. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están entre corchetes.
- 10
- 15 Las figuras 3A y 3B muestran las secuencias de la cadena ligera y la cadena pesada de Pertuzumab (SEQ ID No. 15 y 16, respectivamente). Las CDR están en negrilla. La masa molecular calculada de la cadena ligera y la cadena pesada es 23.526,22 Da y 49.216,56 Da (cisteínas en forma reducida). El resto de hidrato de carbono está unido a la Asn 299 de la cadena pesada.
- 20 Las figuras 4A y 4B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y la cadena pesada de Pertuzumab, que incluye cada una, una secuencia de péptido señal amino terminal intacta (SEQ ID No. 17 y 18, respectivamente).
- 25 La figura 5 representa de forma esquemática la unión de 2C4 al sitio de unión heterodímero de HER2, que previene de esta forma la heterodimerización con EGFR o HER3 activados.
- La figura 6 representa el acoplamiento de HER2/HER3 a las rutas de MAPK y Akt.
- 30 La figura 7 compara las actividades de Trastuzumab y Pertuzumab.
- La figura 8 representa la estabilidad de la formulación de Pertuzumab por análisis de intercambio iónico (IEX).
- La figura 9 muestra la estabilidad de la formulación de Pertuzumab por análisis de cromatografía de exclusión por tamaño molecular (SEC).
- 35 La figura 10 refleja la estabilidad de Pertuzumab en diferentes formulaciones.
- La figura 11 es de un estudio de agitación de formulaciones líquidas de Pertuzumab.
- 40 La figura 12 es de otro estudio de agitación de formulaciones líquidas de Pertuzumab.
- La figura 13 es de un estudio de congelación-descongelación de la formulación de Pertuzumab.
- 45 Las figuras 14A y 14B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de Trastuzumab (SEQ ID No. 13) y la cadena pesada (SEQ ID No. 14).
- Las figuras 15A y 15B representan una secuencia variante de la cadena ligera de Pertuzumab (SEQ ID No. 23) y una secuencia variante de la cadena pesada de Pertuzumab (SEQ ID No. 24).
- 50 La figura 16A y 16B muestra estructuras de oligosacáridos observadas comúnmente en anticuerpos IgG.
- Las figuras 17A y 17B muestran las secuencias de las cadenas ligera y pesada (SEQ ID Nos. 37 – 44) anticuerpos dirigidos contra IgE específicos E25, E26, HAE1 y Hu-901. En la Fig. 17A, los extremos del dominio ligero variable terminan con los restos VEIK, resto 111. En la Fig. 17B, los extremos del dominio pesado variable termina con los restos VTVSS, alrededor del resto 120.
- 55 La figura 18A es un alineamiento de secuencias que compara las secuencias de aminoácidos del dominio variable ligero (V_L) de cada uno del murino 2H7 (SEQ ID No. 25), variante 2H7v16 humanizada (SEQ ID No. 26), y subgrupo de la cadena ligera kappa I humana (SEQ ID No. 27). Las CDR de V_L de 2H7 y hu2H7v16 son las siguientes: CDR1 (SEQ ID No. 57), CDR2 (SEQ ID No. 58), y CDR3 (SEQ ID No. 59).
- 60 La figura 18B es un alineamiento de secuencias que compara las secuencias de aminoácidos del dominio pesado variable (V_H) de cada uno del murino 2H7 (SEQ ID No. 28), variante 2H7v16 humanizada (SEQ ID No. 29), y la

secuencia consenso humana del subgrupo III de la cadena pesada (SEQ ID No. 30). Las CDR de V_H de 2H7 y hu2H7v16 son las siguientes: CDR1 (SEQ ID No. 60), CDR2 (SEQ ID No. 61), y CDR3 (SEQ ID No. 62).

5 **[0050]** En las Fig. 18A y Fig. 18B, las CDR1, CDR2 y CDR3 en cada cadena están encerradas entre corchetes, flanqueadas por las regiones armazón, FR1-FR4, como se indica. 2H7 se refiere al anticuerpo murino 2H7. Los asteriscos entre dos filas de secuencias indican las posiciones que son diferentes entre dos secuencias. La numeración de los restos está de acuerdo con Kabat y col. *Sequences of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), mostrando las inserciones como a, b, c, d y e.

10 La figura 19 representa las secuencias del dominio variable de tres anticuerpos contra VEGF diferentes con SEQ ID Nos. 31 – 36.

15 La figura 20 muestra el perfil de elución de la cromatografía de exclusión por tamaño molecular (SEC) de las siguiente muestras Apomab: (a) control y formulaciones preparadas a (b) pH 4,0, (c) pH 5,0, (d) pH 6,0 y (e) pH 7,0. Las muestras formuladas se almacenaron a 40 °C durante 2 meses antes del análisis.

20 La figura 21 representa el perfil de la tasa de pH para la pérdida del monómero en el anticuerpo Apomab durante el almacenamiento. La cinética del monómero se siguió por SEC durante el almacenamiento a 30 °C y 40 °C y se calcularon las constantes de velocidad de primer orden.

La figura 22 proporciona el perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico (IEC) de muestras de Apomab como sigue: (a) control y formulaciones preparadas a (b) pH 4,0, (c) pH 5,0, (d) pH 6,0 y (e) pH 7,0. Las muestras formuladas se almacenaron a 40 °C durante 2 meses antes del análisis.

25 La figura 23 muestra el perfil de la tasa de pH para la pérdida del pico principal en la IEC durante el almacenamiento. La cinética del pico principal por IEC se siguió durante el almacenamiento a 30 °C y 40 °C y se calcularon las constantes de velocidad de primer orden.

30 La figura 24 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc del ligando Apo-2 (SEQ ID No. 45) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID No. 46). La "N" en la posición del nucleótido 447 (SEQ ID No. 45) se usa para indicar que la base del nucleótido puede ser una "T" o "G".

35 Las figuras 25A y 25B muestran que la secuencia de 411 aminoácidos del receptor DR5 humano (SEQ ID No. 47) como se publica en el documento WO 98/51793 el 19 de noviembre, 1998, y la secuencia de nucleótidos codificante (SEQ ID No. 48).

40 Las figuras 26A y 26B muestran la secuencia de 440 aminoácidos del receptor DR5 humano (SEQ ID No. 49) y la secuencia de nucleótidos codificante (SEQ ID No. 50) como se publica en el documento WO 98/35986 el 20 de agosto, 1998.

La figura 27 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Apomab 7.3 (SEQ ID No. 51).

La figura 28 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Apomab 7.3 (SEQ ID No. 52).

45 La figura 29 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de 16E2 (SEQ ID No. 53) y la cadena pesada de Apomab 7.3 (SEQ ID No. 51).

50 La figura 30 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de 16E2 (SEQ ID No. 54) y la cadena ligera de Apomab 7.3 (SEQ ID No. 52).

Las figuras 31A y 31B representan la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (Fig. 31A; SEQ ID No. 55) y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (Fig. 31B; SEQ ID No. 56) de Apomab 7.3. Los restos de la CDR se identifican en negrilla.

55 La figura 32 muestra un alineamiento de las cadenas ligeras maduras de 2H7v16 y 2H7v511 (SEQ ID Nos. 63 y 64, respectivamente). Las secuencias muestran la numeración de restos del dominio variable de Kabat y la numeración de restos del dominio constante de Eu.

60 La figura 33 muestra un alineamiento de las cadenas pesadas de 2H7v16 y 2H7v511 maduras (SEQ ID Nos. 65 y 66, respectivamente). Las secuencias muestran la numeración de restos del dominio variable de Kabat y la numeración de restos del dominio constante de Eu.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

- 5 **[0051]** La expresión “formulación farmacéutica” se refiere a una preparación que está en una forma que permite que la actividad biológica del principio activo sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. Dichas formulaciones son estériles.
- [0052]** Una formulación “estéril” es aséptica o está exenta de microorganismos vivos y sus esporas.
- 10 **[0053]** En el presente documento, una formulación “congelada” es una a una temperatura inferior a 0 °C. En general, la formulación congelada no está liofilizada, ni se ha sometido antes o se someterá posteriormente a liofilización. Preferiblemente, la formulación congelada comprende el fármaco congelado para la conservación (en depósito de acero inoxidable) o el medicamento congelado (en una configuración final en vial).
- 15 **[0054]** Una formulación “estable” es una en la que la proteína en la misma retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras el almacenamiento. Preferiblemente, la formulación retiene esencialmente su estabilidad física y química, así como su actividad biológica tras el almacenamiento. El periodo de almacenamiento, en general se selecciona basándose en la vida en anaquel pretendida de la formulación. Están disponibles diferentes técnicas analíticas para medir la estabilidad de la proteína en la técnica y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247 – 301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29 – 90 (1993), por ejemplo. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Preferiblemente, la formulación es estable a aproximadamente 40 °C durante al menos aproximadamente 2 – 4 semanas, y/o estable a aproximadamente 5 °C y/o 15 °C durante al menos 3 meses, y/o estable a aproximadamente -20 °C durante al menos 3 meses o al menos 1 año. Además, la formulación preferiblemente es estable después de congelación (p. ej., a -70 °C) y descongelación de la formulación, por ejemplo después de 1, 2 o 3 ciclos de congelación y descongelación. La estabilidad se puede evaluar de forma cualitativa y/o cuantitativa en una variedad de formas diferentes, incluyendo la evaluación de la formación de agregados (por ejemplo usando la cromatografía de exclusión por tamaño molecular, midiendo la turbidez y/o por inspección visual); evaluando la heterogeneidad de la carga usando cromatografía de intercambio catiónico, o electroforesis de zona capilar; análisis de la secuencia amino terminal o carboxi terminal; análisis por espectrometría de masas; análisis por SDS-PAGE para comparar el anticuerpo reducido e intacto; análisis de mapa peptídico (por ejemplo tríptico o LYS-C); evaluación de la actividad biológica o de la función de unión al antígeno del anticuerpo; etc. La inestabilidad puede implicar uno o más de: agregación, desamidación (p. ej., desamidación de Asn), oxidación (p. ej., oxidación de Met), isomerización (p. ej., isomerización de Asp), corte/hidrólisis/fragmentación (p. ej. fragmentación de la región bisagra), formación de succinimida, cisteína (s) desemparejada (s), extensión N-terminal, procesado C-terminal, diferencias de glicosilación, etc.
- 20 25 30 35
- [0055]** Un anticuerpo monoclonal “desaminado” en el presente documento, es uno en el que uno o más restos de asparagina del mismo se han derivatizado, p. ej., en un ácido aspártico o en un ácido isoaspártico.
- 40 **[0056]** Un anticuerpo que es “susceptible de desamidación” es uno que comprende uno o más restos que se ha encontrado que son propensos a la desamidación.
- [0057]** Un anticuerpo que es “susceptible a la agregación” es uno que se ha encontrado que se agrega con otra u otras moléculas de anticuerpo, en especial tras congelación y/o agitación.
- 45 **[0058]** Un anticuerpo que es “susceptible a la fragmentación” es un que se ha encontrado que se escinde en dos o más fragmentos, por ejemplo, en su región bisagra.
- [0059]** Por “reducir la desamidación, agregación o fragmentación” se pretende prevenir o disminuir la cantidad de desamidación, agregación o fragmentación con respecto al anticuerpo monoclonal formulado a un pH diferente a en un tampón diferente.
- 50 **[0060]** En el presente documento, “actividad biológica” de un anticuerpo monoclonal se refiere a la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno y producir una respuesta biológica medible que se pueda medir in vitro o in vivo. Dicha actividad puede ser antagonista (por ejemplo, cuando el anticuerpo es un anticuerpo contra HER2) o agonista (por ejemplo, cuando el anticuerpo se une a DR5). En el caso del Pertuzumab, en una realización, la actividad biológica se refiere a la capacidad del anticuerpo formulado a inhibir la proliferación de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-175-VII. Cuando el anticuerpo es Apomab, la actividad biológica se puede referir, por ejemplo, a la capacidad del anticuerpo formulado a matar las células Colo205 del carcinoma de colon.
- 55 60 **[0061]** Por “isotónico” se entiende que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. En general, las formulaciones isotónicas tendrán una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. La isotonicidad se puede medir usando una presión de vapor o un osmómetro de tipo congelación-hielo, por ejemplo.

[0062] Como se usa en el presente documento, el "tampón" se refiere a una disolución tamponada que resiste cambios de pH por acción de sus componentes ácido-base conjugados. El tampón de esta invención preferiblemente tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, preferiblemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, por ejemplo, de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 6,2, y lo más preferiblemente tiene un pH de aproximadamente 6,0. Los ejemplos de tampones que controlarán el pH en este intervalo incluyen acetato, succinato, succinato, gluconato, histidina, citrato, glicilglicina y otros tampones de ácido orgánico. El tampón preferido en el presente documento es un tampón de histidina.

[0063] Un "tampón de histidina" es un tampón que comprende iones de histidina. Los ejemplos de tampones de histidina incluyen cloruro de histidina, acetato de histidina, fosfato de histidina, sulfato de histidina. El tampón de histidina preferido identificado en los ejemplos en el presente documento, se encontró que era el acetato de histidina. En la realización preferida, el tampón de acetato de histidina se prepara valorando L-histidina (base libre, sólido) con ácido acético (líquido). Preferiblemente, el tampón de histidina o tampón de histidina-acetato tiene un pH de 5,5 a 6,5, preferiblemente pH de 5,8 a 6,2.

[0064] Un "sacárido" en el presente documento comprende la composición general $(\text{CH}_2\text{O})_n$ y sus derivados, incluyendo monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, alcoholes de azúcar, azúcares reductores, azúcares no reductores, etc. Los ejemplos de sacáridos del presente documento incluyen glucosa, sacarosa, trealosa, lactosa, fructosa, maltosa, dextrano, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, silitol, sorbitol, manitol, melibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa, estaquiosa, maltosa, lactulosa, maltulosa, glucitol, maltitol, lactitol, iso-maltulosa, etc. El sacárido preferido en el presente documento es un disacárido no reductor, tal como trealosa o sacarosa.

[0065] En el presente documento, un "tensioactivo" se refiere a un agente tensioactivo, preferiblemente un tensioactivo no iónico. Los ejemplos de tensioactivos en el presente documento incluyen polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80); poloxámero (p. ej. poloxámero 188); Tritón; dodecilsulfato de sodio (SDS); laurilsulfato de sodio; octilglucósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaina; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-betaina (p. ej. lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil-, o isoestearamidopropil-dimetilamina; metilcooil-taurato de sodio, o metiloleil-taurato de disodio; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey); polietilglicol, polipropilglicol, y copolímeros de etilenglicol y propilenglicol (p. ej. Pluronic, PF68, etc.); etc. El tensioactivo preferido en el presente documento es el polisorbato 20.

[0066] Un "receptor HER" es un receptor proteína tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores HER e incluye los receptores EGFR, HER2, HER3 y HER4 y otros miembros de esta familia que se identificarán en el futuro. El receptor HER en general comprenderá un dominio extracelular, que se puede unir a un ligando del HER; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio de tirosina quinasa intracelular conservado; un dominio de señalización carboxilo terminal que alberga varios restos tirosina que se puede fosforilar. Preferiblemente, el receptor HER es una secuencia natural del receptor HER humano.

[0067] El dominio extracelular del HER comprende cuatro dominios, el Dominio I (restos de aminoácidos aproximadamente 1 – 195), Dominio II (restos de aminoácidos aproximadamente 196 – 320), Dominio III (restos de aminoácidos aproximadamente 321 – 488), y Dominio IV (restos de aminoácidos aproximadamente 489 – 632) (numeración de restos sin el péptido señal). Véase, Garrett y col. *Mol. Cell*, 11: 495 – 505 (2003), Cho y col. *Nature* 421: 756 – 760 (2003), Franklin y col. *Cancer Cell* 5: 317 – 328 (2004), o Plowman y col. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 1746 – 1750 (1993). Véase también la figura 1 en el presente documento.

[0068] Los términos "ErbB1", "HER1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico" y "EGFR" se usan de forma intercambiable en el presente documento, y se refieren al EGFR como se describe, por ejemplo, en Carpenter y col. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 881 – 914 (1987), incluyendo formas mutantes naturales del mismo (p. ej., un EGFR mutante por eliminación, como en Humphrey y col. *PNAS (USA)* 87: 4207 – 4211 (1990)). *erbB1* se refiere al gen que codifica el producto proteínico EGFR.

[0069] Las expresiones "ErbB2" y "HER2" se usan de forma intercambiable en el presente documento, y se refieren a la proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba y col., *PNAS (USA)* 82: 6497 – 6501 (1985) y Yamamoto y col. *Nature* 319: 230 – 234 (1986) (número de acceso en Genebank X03363). El término "erbB2" se refiere al gen que codifica ErbB2 humana y "neu" se refiere al gen que codifica p185^{neu} de rata. El HER2 preferido es la secuencia natural humana de HER2.

[0070] "ERbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido receptor, como se describe por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 5.183.884 y 5.480.968 así como en Kraus y col. *PNAS (USA)* 86: 9193 – 9197 (1989).

[0071] Los términos “ErbB4” y HER4” en el presente documento se refieren al polipéptido receptor como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente EP nº 599.274; Plowman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1746 – 1750 (1993); y Plowman y col., *Nature*, 366: 473 – 475 (1993), incluyendo isoformas de los mismos, p. ej., como se describe en el documento WO99/19488, publicado el 22 de abril, 1999.

[0072] Por “ligando del HER” se entiende un polipéptido que se une a y/o activa un receptor HER. El ligando del HER de interés particular en el presente documento es un ligando del HER humano de secuencia natural, tal como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Savage y col., *J. Biol. Chem.* 247: 7612 – 7621 (1972)); factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) (Marquardt y col., *Science* 223: 1079 – 1082 (1984)); anfiregulina también conocida como schwanoma o factor de crecimiento autocrino de queratinocitos (Shoyab y col. *Science* 243: 1074 – 1076 (1989); Kimura y col. *Nature* 348: 257 – 260 (1990); y Cook y col. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2547 – 2557 (1991)); betacelulina (Shing y col., *Science* 259: 1604 – 1607 (1993); y Sasada y col. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 1173 (1993)); factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) (Higashiyama y col., *Science* 251: 936 – 939 (1991)); epiregulina (Toyoda y col., *J. Biol. Chem.* 270: 7495 – 7500 (1995); y Komurasaki y col. *Oncogene* 15: 2841 – 2848 (1997)); una heregulina (véase a continuación); neuregulina-2 (NRG-2) (Carraway y col., *Nature* 387: 512 – 516 (1997)); neuregulina-3 (NRG-3) (Zhang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 9562 – 9567 (1997)); neuregulina-4 (NRG-4) (Harari y col. *Oncogene* 18: 2681 – 89 (1999)) o cripto (CR-1) (Kannan y col. *J. Biol. Chem.* 272 (6): 3330 – 3335 (1997)). Los ligandos del HER que se unen al EGFR incluyen EGF, TGF- α , anfiregulina, betacelulina, HB-EGF y epiregulina. Los ligandos del HER que se unen al HER3 incluyen las heregulinas. Los ligandos del HER capaces de unirse al HER4 incluyen betacelulina, epiregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 y heregulinas.

[0073] “Heregulina” (HRG) cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido codificado por el producto del gen de heregulina como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.641.869 o Marchionni y col., *Nature*, 362: 312 – 318 (1993). Los ejemplos de heregulinas incluyen heregulina- α , heregulina- β 1, heregulina- β 2 y heregulina- β 3 (Holmes y col., *Science*, 256: 1205 – 1210 (1992); y la patente de EE.UU. nº 5.641.869); factor de diferenciación *neu* (NDF) (Peles y col. *Cell* 69: 205 – 216 (1992)); actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls y col. *Cell* 72: 801 – 815 (1993)); factores de crecimiento gliales (GGF) (Marchionni y col., *Nature*, 362: 312 – 318 (1993)); factores derivados de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho y col. *J. Biol. Chem.* 270: 14523 – 14532 (1995)); γ -heregulina (Schaefer y col. *Oncogene* 15: 1385 – 1394 (1997)). El término incluye fragmentos biológicamente activos y/o variantes de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido HRG de secuencia natural, tal como un fragmento del dominio de tipo EGF del mismo (p. ej., HRG β 1₁₇₇₋₂₄₄).

[0074] En el presente documento un “dímero de HER” es un dímero asociado de forma no covalente que comprende al menos dos receptores HER diferentes. Dichos complejos se pueden formar cuando una célula que expresa dos o más receptores HER es expuesta a un ligando de HER y se puede aislar por inmunoprecipitación y analizar por SDS-PAGE como se describe, por ejemplo, en Sliwkowski y col., *J. Biol. Chem.*, 269 (20): 14661 – 14665 (1994). Los ejemplos de dichos dímeros de HER incluyen los heterodímeros EGFR-HER2, HER2-HER3 y HER3-HER4. Además, el dímero de HER puede comprender dos o más receptores HER2 combinados con un receptor HER diferente, tal como HER3, HER4 o EGFR. Otras proteínas, tales como una subunidad de receptor de citoquina (p. ej., gp130) se puede asociar con el dímero.

[0075] Un “sitio de unión heterodímero” en HER2, se refiere a una región en el dominio extracelular del HER2 que se pone en contacto o interactúa con una región en el dominio extracelular de EGFR, HER3 o HER4 tras la formación de un dímero con el mismo, La región se encuentra en el Dominio II del HER2. Franklin y col. *Cancer Cell* 5: 317 – 328 (2004).

[0076] La “activación de HER” o “activación de HER2” se refiere a la activación o fosforilación, de cualquiera de uno o más receptores HER o receptores HER2. En general, la activación de HER produce una transducción de señales (p. ej., que es producida por un dominio de quinasa intracelular de un receptor HER que fosforila restos de tirosina en el receptor HER o un polipéptido sustrato). La activación de HER puede ser mediada por ligando de HER que se une a un dímero de HER que comprende el receptor HER de interés. El ligando de HER que se une a un dímero de HER puede activar un dominio de quinasa de uno o más de los receptores HER en el dímero y de esta forma produce la fosforilación de restos tirosina en uno o más de los receptores HER y/o fosforilación de restos tirosina en polipéptido (s) sustrato adicional (es), tales como quinasas intracelulares Akt o MAPK.

[0077] El término “anticuerpo” en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales de longitud completa, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos de longitud completa, y fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

[0078] La expresión “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto para posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes en general presentes en

cantidades minoritarias. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en cuanto que no están contaminados con otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe considerarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención, se pueden hacer por el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., *Nature*, 256: 495 (1975), o se puede hacer por procedimientos de ADN recombinantes (véase, p. ej., la patente de EE.UU. nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson y col., *Nature*, 352: 624 – 628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 – 597 (1991).

[0079] Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de una especie particular, o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la o las cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851 – 6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión al antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (p. ej., mono del viejo mundo, simio, etc.) y secuencias de la región constante humana.

[0080] Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, que comprende preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F (ab')₂, y Fv; fragmentos divalentes; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de una cadena; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento (s) de anticuerpo (s).

[0081] Un "anticuerpo de longitud completa" es uno que comprende una región variable de unión al antígeno así como un dominio constante de la cadena ligera (C_L) y dominios constantes de la cadena pesada, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia natural (p. ej., dominios constantes de la secuencia natural humana) o variantes de la secuencia de aminoácidos de la misma. Preferiblemente, el anticuerpo de longitud completa tiene una o más funciones efectoras.

[0082] La expresión "anticuerpo de la especie principal" en el presente documento se refiere a la estructura de anticuerpo en una composición en la que es la molécula de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición. Por ejemplo, el anticuerpo de la especie principal puede ser un anticuerpo contra HER2, tal como un anticuerpo que se une al dominio II del HER2, anticuerpo que inhibe la dimerización de HER más eficazmente que Trastuzumab, y/o un anticuerpo que se une a un sitio de unión heterodímero del HER2. En el presente documento se describe un anticuerpo contra HER2 que comprende las secuencias de aminoácidos ligera variable y pesada variable en las SEQ ID Nos 3 y 4, y lo más preferiblemente que comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y la cadena pesada de las SEQ ID Nos. 15 y 16 (Pertuzumab).

[0083] Un anticuerpo "variante en la secuencia de aminoácidos" en el presente documento es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que difiere de la de un anticuerpo de la especie principal. Normalmente, las variantes de secuencias de aminoácidos tendrán al menos aproximadamente 70 % de homología con el anticuerpo de la especie principal, y preferiblemente, tendrán al menos aproximadamente 80 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 90 % de homología con el anticuerpo de la especie principal. Las variantes de secuencias de aminoácidos tienen sustituciones, eliminaciones y/o adiciones en determinadas posiciones dentro o adyacentes a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la especie principal. Los ejemplos de variantes de secuencias de aminoácidos en el presente documento incluyen variantes ácidas (p. ej., variante de anticuerpo desamidada), variante básica, el anticuerpo con una extensión líder amino terminal (p. ej., VHS) en una o dos de las cadenas ligeras del mismo, anticuerpo con un resto lisina C-terminal en una o dos de las cadenas pesadas del mismo, etc., e incluye combinaciones de variaciones de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y/o ligeras. La variante del anticuerpo de interés particular en el presente documento, es el anticuerpo que comprende una extensión líder amino terminal en una o dos cadenas ligeras del mismo, que opcionalmente comprende además otra secuencia de aminoácidos y/o diferencias de glicosilación con respecto al anticuerpo de la especie principal.

[0084] Un "anticuerpo monoclonal terapéutico" es un anticuerpo usado para la terapia de un sujeto humano. Los anticuerpos monoclonales terapéuticos descritos en el presente documento incluyen: anticuerpos contra HER2 para cáncer y diferentes enfermedades o trastornos de tumores no malignos; anticuerpos contra CD20 o BR3 para la terapia de tumores malignos de linfocitos B, enfermedades autoinmunitarias, rechazo de injerto, o bloqueo de una respuesta inmunitaria a un antígeno extraño; anticuerpos IgE para la terapia de un trastorno mediado por la IgE; anticuerpos contra DR5 o VEGF para la terapia del cáncer.

- 5 **[0085]** Un anticuerpo “variante de glicosilación” en el presente documento es un anticuerpo con uno o más restos hidrato de carbono unidos al mismo, que difieren de uno o más restos de hidrato de carbono unidos a un anticuerpo de la especie principal. Los ejemplos de variantes de glicosilación en el presente documento incluyen el anticuerpo con una estructura de oligosacárido G1 o G2, en lugar de una estructura de oligosacárido G0, unida a una región Fc del mismo, el anticuerpo con uno o dos restos hidrato de carbono unidos a una o dos cadenas ligeras del mismo, el anticuerpo sin hidrato de carbono unido a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, etc., y combinaciones de alteraciones de glicosilación.
- 10 **[0086]** Cuando el anticuerpo tiene una región Fc, puede estar unida una estructura de oligosacárido tal como la mostrada en la figura 16 del presente documento, a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, p. ej., el resto 299 (298, numeración de restos EU). Para Pertuzumab, G0 era la estructura de oligosacárido predominante, encontrándose en menores cantidades otras estructuras de oligosacáridos tales como G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1 (1 – 6), G1 (1 – 3) y G2 en la composición de Pertuzumab.
- 15 **[0087]** Salvo que se indique lo contrario, una “estructura de oligosacárido G1” en el presente documento incluye estructuras G – 1, G1 – 1, G1 (1 – 6) y G1 (1 – 3).
- 20 **[0088]** Una “extensión líder amino terminal” en el presente documento se refiere a uno o más restos de aminoácidos de la secuencia líder amino terminal que están presentes en el extremo amino de una o más cadenas pesadas o ligeras de un anticuerpo. Una extensión líder amino terminal de ejemplo comprende o consiste en tres restos de aminoácidos, VHS, presentes en una o ambas cadenas ligeras de una variante de anticuerpo.
- 25 **[0089]** “Homología” se define como un porcentaje de restos en la variante de la secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de homología. Los procedimientos y programas de ordenador para el alineamiento son bien conocidos en la materia. Uno de dichos programas de ordenador es "Align 2", producido por Genentech, Inc., que se presentó con la documentación de usuario en la United States Copyright Office, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre, 1991.
- 30 **[0090]** Las “funciones efectoras” del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (p. ej., receptor de linfocitos B; BCR), etc.
- 35 **[0091]** Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, los anticuerpos de longitud completa se pueden asignar a diferentes “clases”. Hay cinco clases principales de anticuerpos de longitud completa: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de ellas se pueden dividir en “subclases” (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.
- 40 **[0092]** La “citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo” y “ADCC” se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (p. ej., linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente producen la lisis de la célula diana. Las células principales para la mediación de la ADCC, las células NK, expresan Fc γ RIII solo, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 de la página 464 de Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457 – 92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC in vitro, tal como el que se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar in vivo, p. ej., en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes y col. *PNAS (USA)* 95: 652 – 656 (1998).
- 50 **[0093]** Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y llevan a cabo funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos Fc γ RIII y realizan la función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; siendo las preferidas las PBMC y los linfocitos NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente natural de las mismas, p. ej., sangre o PBMC como se describe en el presente documento.
- 60 **[0094]** Las expresiones “receptor Fc” o “FcR” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferido es uno que se une

a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activante") y Fc γ RIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activante Fc γ RIIA contiene un patrón de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor Fc γ RIB contiene un patrón de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase la revisión M. en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203 – 234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457 – 92 (1991); Capel y col., *Immunomethods* 4: 25 – 34 (1994); y de Haas y col., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330 – 41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identificarán en el futuro, están englobados por el término "FcR" del presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) and Kim y col., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)).

[0095] La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula para lisar una diana en presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (p. ej., un anticuerpo) que forma complejo con un antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, p. ej., como describen Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

[0096] Los "anticuerpos nativos" son normalmente glucoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro entre cadenas espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada.

[0097] El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones armazón (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cada una 4 FR, que adoptan en su mayor parte una configuración de lámina β , conectadas por 3 regiones hipervariables que forman bucles que se conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas entre sí en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase, Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diferentes funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0098] La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable en general comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (p. ej., los restos 24 – 34 (L1), 50 – 56 (L2) y 89 – 97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y restos 31 – 35 (H1), 50 – 65 (H2) y 95 – 102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (p. ej., los restos 26 – 32 (L1), 50 – 52 (L2) y 91 – 96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y restos 26 – 32 (H1), 53 – 55 (H2) y 96 – 101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901 – 917 (1987)). Los restos de la "región armazón" o "FR" son los restos de los dominios variables distintos de los restos de la región hipervariable como se define en el presente documento.

[0099] La digestión de anticuerpos por la papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F (ab')₂ que tiene dos sitios de unión al antígeno y todavía es capaz de reticulación con el antígeno.

[0100] El "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento del antígeno y unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera en una asociación fuerte no covalente. En esta configuración las tres regiones hipervariables de cada

dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las 6 regiones hipervariables confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo 3 regiones hipervariables específicas para el antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unir el antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión entero.

[0101] El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para el Fab' en el que el o los restos de cisteína de los dominios constantes llevan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F (ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0102] Las "cadenas ligeras" de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basado en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0103] Los fragmentos de anticuerpos "Fv de una sola cadena" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de scFv, véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, páginas. 269 – 315 (1994). Los fragmentos scFv del anticuerpo contra HER2 se describen en el documento WO93/16185; patente de EE.UU. n° 5.571.894; y patente de EE.UU. n° 55.587.458.

[0104] La expresión "fragmentos divalentes" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio pesado variable (V_H) conectado a un dominio ligero variable (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H-V_L). Mediante el uso de un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los fragmentos divalentes se describen de forma más completa, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444 – 6448 (1993).

[0105] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej. roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en el que se sustituyen restos de una región hipervariable del receptor por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo del donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región armazón (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo del receptor o en el anticuerpo del donador. Estas modificaciones se hacen para refinar más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y típicamente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col., *Nature* 321: 522 – 525 (1986); Riechmann y col., *Nature* 332: 323 – 329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593 – 596 (1992).

[0106] Los anticuerpos contra HER2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 o Trastuzumab (HERCEPTIN®) como se describe en la tabla 3 de la patente de EE.UU. n° 5.821.337; anticuerpos 520C9 humanizado (documento WO93/21319) y 2C4 humanizado, como se describe en el presente documento.

[0107] Para los propósitos del presente documento "Trastuzumab," "HERCEPTIN®," y "huMAb4D5-8" se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada de las SEQ ID NOS. 13 y 14, respectivamente.

[0108] En el presente documento, "Pertuzumab," "rhuMAb 2C4," y "OMNITARG™" se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos ligera variable y variable pesada de las SEQ ID NOS. 3 y 4, respectivamente. Cuando Pertuzumab es un anticuerpo de longitud completa, comprende preferiblemente las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y la cadena pesada de las SEQ ID NOS. 15 y 16, respectivamente.

[0109] Un “anticuerpo desnudo” es un anticuerpo (como se define en el presente documento) que no está conjugado con una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico o radiomarcador.

[0110] Un anticuerpo de “afinidad madura” es uno con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables del mismo, que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, comparado con un anticuerpo original que no tiene dicha o dichas alteraciones. Los anticuerpos de afinidad madura preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madura se producen mediante procedimientos conocidos en la materia. Marks y col. *Bio/Technology* 10: 779 – 783 (1992) describen la maduración de la afinidad por barajado de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de las CDR y/o restos de la región armazón se describen en: Barbas y col. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91: 3809 – 3813 (1994); Schier y col. *Gene* 169: 147 – 155 (1995); Yelton y col. *J. Immunol.* 155: 1994 – 2004 (1995); Jackson y col., *J. Immunol.* 154 (7): 3310 – 9 (1995); y Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226: 889 – 896 (1992).

[0111] Un “anticuerpo agonista” es un anticuerpo que se une y activa un receptor. En general, la capacidad de activación del receptor del anticuerpo agonista será al menos cualitativamente similar (y puede ser esencialmente cuantitativamente similar) a un ligando agonista natural del receptor. Un ejemplo de un anticuerpo agonista es uno que se une a un receptor en la superfamilia de receptores de TNF, tal como DR5, e induce apoptosis de las células que expresan el receptor de TNF (p. ej. DR5). Se describen ensayos para determinar la inducción de la apoptosis en los documentos WO98/51793 y WO99/37684.

[0112] Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de 95 % en peso del anticuerpo, determinado por el procedimiento de Lowry, y los más preferiblemente más de 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna, usando un secuenciador de de vaso giratorio, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie, o preferiblemente tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ en células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, normalmente el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

[0113] Un anticuerpo contra HER2 que “inhibe la dimerización del HER de forma más eficaz que Trastuzumab” es uno que reduce o elimina los dímeros de HER de forma más eficaz (por ejemplo, al menos aproximadamente 2 veces más eficaz) que Trastuzumab. Preferiblemente, dicho anticuerpo inhibe la dimerización de HER2 al menos aproximadamente de forma tan eficaz como un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal murino 2C4, un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal murino 2C4, Pertuzumab, y un fragmento Fab de Pertuzumab. Se puede evaluar la inhibición de la dimerización de HER estudiando los dímeros de HER directamente, o evaluando la activación de HER, o mediante señalización corriente abajo que se produce a partir de la dimerización de HER, y/o evaluando el sitio de unión anticuerpo-HER2, etc. Los ensayos para la selección de anticuerpos según su capacidad para inhibir la dimerización de HER de forma más eficaz que Trastuzumab, se describen en Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127 – 137 (2002) y el documento WO01/00245 (Adams y col.). Solo a modo de ejemplo, se puede ensayar la inhibición de la dimerización de HER evaluando, por ejemplo, la inhibición de la formación del dímero de HER (véase, p. ej., Fig. 1A – B de Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127 – 137 (2002); y documento WO01/00245); la reducción en la activación del ligando del HER de células que expresan dímeros de HER (documento WO01/00245 y Fig. 2A – B de Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127 – 137 (2002), por ejemplo); el bloqueo de la unión del ligando de HER a células que expresan los dímeros de HER (documento WO01/00245, y Fig. 2E de Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127 – 137 (2002), por ejemplo); la inhibición del crecimiento celular de células cancerosas (p. ej., células MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D) que expresan dímeros de HER en presencia (o ausencia) del ligando de HER (documento WO01/00245 y Figs. 3A – D de Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127 – 137 (2002), por ejemplo); la inhibición de la señalización corriente abajo (por ejemplo, inhibición de la fosforilación de AKT dependiente de HRG o inhibición de la fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF α) (véase, el documento WO01/00245, y Fig. 2C – D de Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127 – 137 (2002), por ejemplo). También se puede evaluar si el anticuerpo inhibe la dimerización de HER estudiando el sitio de unión anticuerpo-HER2, por ejemplo, evaluando una estructura o modelo, tal como una estructura cristalina, del anticuerpo unido a HER2 (véase, por ejemplo, Franklin y col. *Cancer Cell* 5: 317 – 328 (2004)).

[0114] El anticuerpo contra HER2 puede “inhibir la fosforilación de AKT dependiente de HRG” y/o “inhibir la fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF α ” de forma más eficaz (por ejemplo al menos 2 veces más eficaz) que Trastuzumab (véase Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127 – 137 (2002), a modo de ejemplo).

[0115] El anticuerpo contra HER2 puede ser uno que “no inhiba la escisión del ectodominio de HER2” (Molina y col. *Cancer Res.* 61: 4744 – 4749 (2001)).

[0116] El anticuerpo contra HER2 que “se une a un sitio de unión heterodímero” de HER2, se une a restos en el dominio II (y opcionalmente también se une a restos en otro de los dominios del dominio extracelular de HER2, tal como los dominios I y III), y puede impedir estéricamente, al menos en cierta medida, la formación de un heterodímero HER2-EGFR, HER2-HER3, o HER2-HER4. Franklin y col. *Cancer Cell* 5: 317 – 328 (2004) caracterizan la estructura cristalina de HER2-Pertuzumab, depositada en el banco de datos de proteínas RCSB (Código ID IS78), que ilustra un anticuerpo de ejemplo que se une al sitio de unión heterodímero de HER2.

[0117] Un anticuerpo que “se une al dominio II” de HER2, se une a restos en el dominio II y opcionalmente a restos en el otro u otros dominios de HER2, tales como los dominios I y III. Preferiblemente, el anticuerpo que se une al dominio II se une a la unión entre los dominios I, II y III de HER2.

[0118] Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, en especial una célula cancerosa que expresa el HER, in vitro o in vivo. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células que expresan el HER en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el avance del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención en la fase G1 y M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes de detención en G1 también afectan a la detención en la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede encontrar más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” de Murakami y col. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), en especial la página 13.

[0119] Los ejemplos de anticuerpos “inhibidores del crecimiento” son los que se unen a HER2 e inhiben el crecimiento de células cancerosas que expresan HER2 en exceso. Los anticuerpos contra HER2 inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de las células de tumor de mama SK-BR-3 en cultivo celular en más de 20 %, y preferiblemente más de 50 % (p. ej., de aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 %) con una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml, en el que la inhibición del crecimiento se determina 6 días después de la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase la patente de EE.UU. nº 5.677.171, concedida el 14 de octubre, 1997). El ensayo de inhibición del crecimiento de células SK-BR-3 se describe con más detalle en la patente y en lo sucesivo. El anticuerpo inhibidor del crecimiento preferido es una variante humanizada del anticuerpo monoclonal murino 4D5 monoclonal, p. ej., Trastuzumab.

[0120] Un anticuerpo que “induce apoptosis” es uno que induce la muerte celular programada, determinada por la unión de la anexina V, fragmentación del ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (llamadas cuerpos apoptóticos). La célula normalmente es una que expresa el antígeno al que se une el anticuerpo. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral. Por ejemplo, se puede medir la translocación de la fosfatidil serina (PS) mediante unión de la anexina; la fragmentación de ADN se puede evaluar por la escalera de ADN; y la condensación de la cromatina nuclear junto con la fragmentación de ADN se pueden evaluar mediante cualquier aumento de las células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es uno que produce aproximadamente de 2 a 50 veces, preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 veces, y los más preferiblemente de aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de la unión de anexina con respecto a la célula no tratada, en un ensayo de unión de anexina usando células que expresan un antígeno al que se une el anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos que inducen la apoptosis son los anticuerpos contra HER2 7C2 y 7F3, y algunos anticuerpos DR5.

[0121] El “epítipo 2C4” es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo 2C4. Con el fin de seleccionar anticuerpos que se unen al epítipo 2C4, se puede llevar a cabo un ensayo de bloqueo cruzado rutinario como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, se puede realizar el cartografiado del epítipo para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 2C4 de HER2. El epítipo 2C4 comprende restos del dominio II en el dominio extracelular de HER2. 2C4 y Pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en la unión de los dominios I, II y III. Franklin y col. *Cancer Cell* 5: 317 – 328 (2004).

[0122] El “epítipo 4D5” es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y Trastuzumab. Este epítipo está cerca del dominio transmembrana de HER2, y dentro del dominio IV de HER2. Para seleccionar anticuerpos que se unen al epítipo 4D5, se puede llevar a cabo un ensayo de bloqueo cruzado rutinario como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, se puede realizar el cartografiado del epítipo para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 4D5 de HER2 (p. ej., uno cualquiera o más de los restos en la región desde aproximadamente el resto 529 a aproximadamente el resto 625, inclusive, de HER2). El “epítipo 7C2/7F3” es la región del extremo amino, dentro del Dominio I, del dominio extracelular de HER” al que se unen los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (cada uno depositado con el ATCC, véase a continuación). Para seleccionar anticuerpos que se unen al epítipo 7C2/7F3, se

puede llevar a cabo un ensayo de bloqueo cruzado rutinario como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, se puede realizar el cartografiado del epítipo para establecer si el anticuerpo se une al epítipo 7C2/7F3 en HER2 (p. ej., uno cualquiera o más de los restos en la región desde aproximadamente el resto 22 a aproximadamente el resto 53 de HER2).

[0123] “Tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como profiláctico o a las medidas de prevención. Los que necesitan el tratamiento incluyen los que ya tienen la enfermedad así como aquellos en los que se va a prevenir la enfermedad. Por lo tanto, el paciente que se va a tratar, en el presente documento puede haber sido diagnosticado o puede tener una predisposición o ser susceptible a la enfermedad.

[0124] Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por el crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitar, carcinoma, linfoma, blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma, y cáncer de células del islote), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma, y leucemia o tumores linfoides malignos. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (p. ej., cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer peritoneal, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello.

[0125] La expresión “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para una enfermedad en un paciente. Cuando la enfermedad es el cáncer, la cantidad eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en alguna medida y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en alguna medida y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en alguna medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en alguna medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en la que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad eficaz puede prolongar la supervivencia sin avance, producir una respuesta objetiva (incluyendo una respuesta parcial, RP, o respuesta completa, RC), aumentar el tiempo de supervivencia general, y/o mejorar uno o más síntomas del cáncer.

[0126] Un “cáncer que expresa HER2” es uno que comprende células que tienen la proteína HER2 presente en su superficie celular.

[0127] Un cáncer que “expresa en exceso” un receptor HER es un que tiene niveles significativamente mayores de un receptor HER, tal como HER2, en la superficie de las células del mismo, comparado con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicho exceso de expresión puede estar causado por la amplificación de genes o por un aumento de la transcripción o traducción. El exceso de expresión del receptor HER se puede determinar en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles aumentados de la proteína HER presente en la superficie de una célula (p. ej., por un ensayo inmunohistoquímico; IHC). Alternativa o adicionalmente, se pueden medir los niveles del ácido nucleico que codifica HER en la célula, por ejemplo, por hibridación fluorescente in situ (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre, 1998), transferencia Southern o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar el exceso de expresión del receptor HER midiendo el antígeno circulante (p. ej., dominio extracelular de HER) en un fluido biológico tal como el suero (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.933.294 concedida el 12 de junio, 1990; documento WO91/05264 publicado el 18 de abril, 1991; patente de EE.UU. nº 5.401.638 concedida el 28 de marzo, 1995; y Sias y col. *J. Immunol. Methods* 132: 73 – 80 (1990)). Además de los ensayos anteriores, están disponibles diferentes ensayos in vivo para el experto en la materia. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que se ha marcado opcionalmente con un marcador detectable, p. ej., un isótopo radiactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células en el paciente, p. ej., mediante el barrido externo de radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

[0128] A la inversa, un cáncer “que no expresa en exceso el receptor HER” es uno que no tiene expresión mayor que la de los niveles normales del receptor HER2 comparado con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido.

[0129] Un cáncer que “expresa en exceso” un ligando de HER es uno que produce niveles significativamente superiores de ese ligando comparado con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicho exceso de expresión puede estar causado por la amplificación de genes o por una mayor transcripción o traducción. El exceso

de expresión de ligando HER se puede determinar mediante diagnóstico evaluando los niveles del ligando (o del ácido nucleico que lo codifica) en el paciente, p. ej., en una biopsia de tumor o por diferentes ensayos de diagnóstico tales como IHC, FISH, transferencia Southern, PCR o ensayos in vivo descritos antes.

5 **[0130]** La expresión “agente citotóxico” como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Se pretende que la expresión incluya isótopos radiactivos (p. ej. At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos del Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como moléculas pequeñas toxinas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos.

10 **[0131]** Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (en especial bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposido; criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreuro del óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como antibióticos enodiínicos (p. ej., caliqueamicina, en especial caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omega11 (véase, p. ej., *Agnew, Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183 – 186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como el comóforo neocarzinostatina y cromóforos antibióticos enodiínicos relacionados con cromoproteína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinornicina, carabicina, carminomicina, carzinofolina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, ciano-morfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de doxorubicina HCl liposomal (DOXIL®), doxorubicina liposomal TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposomal pegilada (CAELYX®), y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona, y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopteralina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; restablecedor de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo PSK® de polisacáridos (*JHS Natural Products*, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas de albúmina genomanipuladas de paclitaxel (ABRAXANE™), y docetaxel (TAXOTERE®); cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino, y carboplatino; vincas, que previenen la polimerización de tubulina para formar microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovovina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, incluyendo bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano del nucleósido de citosina); oligonucleótidos de sentido contrario, en particular los que inhiben la expresión de genes en la ruta de señalización en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (p. ej., LURTOTECAN®); rnrh (p. ej., ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosina, inhibidor de la COX-2 (p. ej. celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosoma (p. ej. PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores del EGFR (véase la

definición más adelante); inhibidores de tirosina quinasa (véase la definición más adelante); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

[0132] En esta definición también están incluidos agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas en tumores tales como antiestrógenos con perfil mixto agonista/antagonista, incluyendo, tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (VISTA®), trioxifeno, keoxifeno, y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM) tales como SERM3; antiestrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®), y EM800 (dichos agentes pueden bloquear la dimerización de receptores de estrógenos (ER), inhibir la unión a ADN, aumentar la recuperación de ER y/o suprimir niveles de ER); inhibidores de aromatasa, incluyendo inhibidores esteroideos de aromatasa tales como formestano y exemestano (AROMASIN®), e inhibidores no esteroideos de aromatasa tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de aromatasa incluyendo vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol, imidazol; agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante, incluyendo leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina, y triptorelina; esteroides sexuales, incluyendo progestinas tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilestilbestrol y peminin, y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, ácido todo-transretinico y fenretinida; onapristona; anti-progesteronas; reguladores por disminución de receptores de estrógenos (ERD); antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; testolactona; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

[0133] Como se usa en el presente documento, la expresión “fármaco dirigido al EGFR” se refiere a un agente terapéutico que se une al EGFR y, opcionalmente inhibe la activación del EGFR. Los ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen al EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase la patente de EE.UU. nº 4.943.533, Mendelsohn y col.) y variantes del mismo tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano reformado (H225) (véase, el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (patente de EE.UU. nº 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen al EGFR como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF (véase el documento WO98/50433, Abgenix). El anticuerpo dirigido contra EGFR puede estar conjugado con un agente citotóxico, generando así un inmunoconjugado (véase, p. ej., el documento EP659439A2, Merck Patent GmbH). Los ejemplos de moléculas pequeñas que se unen al EGFR incluyen ZD1839 o Gefitinib (IRESSA™; Astra Zeneca), CP-358774 o Erlotinib HCL (TARCEVA™; Genentech/OSI) y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen).

[0134] Un “inhibidor de tirosina quinasa” es una molécula que inhibe en alguna medida la actividad de tirosina quinasa de una tirosina quinasa tal como un receptor HER. Los ejemplos de dichos inhibidores incluyen los fármacos dirigidos al EGFR indicados en el párrafo anterior, así como moléculas pequeñas inhibitoras de tirosina quinasa HER2 tales como TAK165 disponible en Takeda, inhibidores de HER dobles tales como EKB-569 (disponible en Wyeth) que se une con preferencia al EGFR pero inhibe a las células que expresan en exceso tanto HER2 como EGFR, GW572016 (disponible en Glaxo) un inhibidor oral de tirosina quinasa HER2 y EGFR, y PKI-166 (disponible en Novartis); inhibidores de pan-HER tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1 tales como el agente antisentido ISIS-5132 disponible en ISIS Pharmaceuticals que inhibe la señalización de Raf-1; inhibidores de TK no dirigidos a HER tales como mesilato de imatinib (Gleevec™) disponible en Glaxo; inhibidor de quinasa I regulado por MAPK extracelular CI-1040 (disponible en Pharmacia); quinazolininas, tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino)quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidinss; curcumina (diferuloil-metano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen restos nitroiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas de sentido contrario (p. ej. las que se unen al ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (patente de EE.UU. nº 5,804,396); tirfostinas (patente de EE.UU. nº 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores pan-HER tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de imatinib (Gleevec; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: patente de EE.UU. nº 5.804.396; WO99/09016 (American Cyanamid); WO98/43960 (American Cyanamid); WO97/38983 (Warner Lambert); WO99/06378 (Warner Lambert); WO99/06396 (Warner Lambert); documento WO96/30347 (Pfizer, Inc); WO96/33978 (Zeneca); WO96/3397 (Zeneca); y WO96/33980 (Zeneca).

[0135] Un “agente antiangiogénico” se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado en, el desarrollo de los vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o anticuerpo que se une a un factor de crecimiento o receptor de factor de crecimiento implicado en la promoción de la

angiogénesis. El factor antiangiogénico preferido en el presente documento es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), tal como Bevacizumab (AVASYIN®).

5 **[0136]** El término “citoquina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúa en otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas están incluidas hormonas del crecimiento tales como la hormona de crecimiento humana, N-metionil-hormona de crecimiento humana y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas tales como la hormona foliculoestimulante (FSH), hormona estimulante de tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral α y β ; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); factores de crecimiento nerviosos tales como NGF- β ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TNF- β ; factor de crecimiento 1 y II de tipo insulina; eritropoietina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón- α , - β , y - γ ; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, 1L-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de citoquinas de secuencia nativa.

15 **[0137]** El anticuerpo que se formula preferiblemente es esencialmente puro y convenientemente esencialmente homogéneo (es decir, carece de proteínas contaminantes etc.). Anticuerpo “esencialmente puro” significa una composición que comprende al menos aproximadamente 90 % en peso del anticuerpo, basado en el peso total de la composición, preferiblemente al menos aproximadamente 95 % en peso. Un anticuerpo “esencialmente homogéneo” significa una composición que comprende al menos aproximadamente 99 % en peso de anticuerpo, basado en el peso total de la composición.

25 **[0138]** Un “marcador de superficie de linfocitos B” o “antígeno de superficie de linfocitos B” en el presente documento es un antígeno expresado en la superficie de un linfocito B al que se puede dirigir un anticuerpo que se une al mismo. Los marcadores de superficie de linfocitos B de ejemplo incluyen los marcadores de superficie de leucocitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86 (para las descripciones véase *The Leukocyte Antigen Facts Book*, 2ª Edición. 1997, ed. Barclay y col. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Otros marcadores de superficie de linfocitos B incluyen RP105, FcRH2, B-cell CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Bt1g, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, y 239287. El marcador de superficie de linfocitos B de interés particular en el presente documento se expresa con preferencia en linfocitos B comparado con otros tejidos sin linfocitos B de un mamífero y puede ser expresado tanto en linfocitos B precursores como en linfocitos B maduros. El marcador de superficie de linfocitos B preferido en el presente documento es CD20 o BR3.

30 **[0139]** El antígeno “CD20” o “CD20”, es una fosfoproteína no glicosilada de aproximadamente 35 kDa encontrada en la superficie de más de 90 % de los linfocitos B de la sangre periférica y órganos linfoides. CD20 está presente tanto en linfocitos B normales como en linfocitos B malignos, pero no se expresa en citoblastos. Otros nombres para CD20 en la bibliografía incluyen “antígeno restringido a linfocitos B” y “Bp35”. El antígeno CD20 se describe en Clark y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82: 1766 (1985), por ejemplo.

35 **[0140]** Solo para los propósitos del presente documento “2H7 humanizado” se refiere a una variante humanizada del anticuerpo 2H7 cuyas secuencias de CDR se describen en la patente de EE.UU. nº 5.500.362 (Figs. 5 y 6). Los ejemplos de anticuerpos 2H7 humanizados en el presente documento incluyen variantes descritas en el documento WO2004/056312, así como otras variantes, incluyendo, pero sin limitar: 2H7v16, 2H7v31, 2H7v73, 2H7v75, 2H7v96, 2H7v114, 2H7v115, 2H7v116, 2H7v138, 2H7v477, 2H7v375, etc.

40 **[0141]** Un anticuerpo 2H7 humanizado puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las siguientes secuencias de la CDR:
 45 secuencia CDR L1 RASSSVSYXH en la que X es M o L (SEQ ID No. 67), por ejemplo la SEQ ID No. 57 (Fig. 18A),
 secuencia CDR L2 de SEQ ID No. 58 (Fig. 18A),
 50 secuencia CDR L3 QQWXFNPPT en la que X es S o A (SEQ ID No. 68), por ejemplo la SEQ ID No. 59 (Fig. 18A),
 secuencia CDR H1 de SEQ ID No. 60 (Fig. 18B),
 secuencia CDR H2 AIYPGNGXTSYNQKFKG en la que X es D o A (SEQ ID No. 69), por ejemplo SEQ ID No. 61 (Fig. 18B), y

secuencia CDR H3 VVYYSSXXYWYFDV en la que X en la posición 6 es N, A, Y, W o D, y X en la posición 7 es S o R (SEQ ID No. 70), por ejemplo SEQ ID No. 62 (Fig. 18B).

5 **[0142]** Las secuencias de CDR anteriores en general están presentes en las secuencias de la región armazón de la cadena ligera variable y pesada variable, tal como sustancialmente los restos de la FR consenso humana del subgrupo de la cadena ligera kappa I humana ($V_L \kappa I$) y sustancialmente los restos de la FR consenso humana del subgrupo de cadena pesada III humana ($V_H III$). Véase también, el documento WO 2004/056312 (Lowman y col.).

10 **[0143]** La región pesada variable se puede unir a una región constante de la cadena de IgG humana, en la que la región puede ser, por ejemplo, IgG1 o IgG3, incluyendo la secuencia natural y variantes de regiones constantes.

15 **[0144]** Dicho anticuerpo puede comprender la secuencia del dominio pesado variable de SEQ ID No. 29 (v16, como se muestra en la Fig. 18B), comprendiendo también opcionalmente la secuencia del dominio ligero variable de SEQ ID No. 26 (v16, como se muestra en la Fig. 18A), que opcionalmente comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 56, 100, y/o 100a, p. ej. D56A, N100A o N100Y, y/o S100aR en el dominio pesado variable, y una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 32 y/o 92, p. ej. M32L y/o S92A, en el dominio variable ligero. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo intacto que comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID Nos. 63 o 64, y las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID No. 65, 66, 71 o 72.

20 **[0145]** Un anticuerpo 2H7 humanizado preferido es ocrelizumab (Genentech).

25 **[0146]** El anticuerpo en el presente documento puede comprender además al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que mejora la actividad de ADCC, tal como una en la que las sustituciones de aminoácidos están en las posiciones 298, 333, y 334, preferiblemente S298A, E333A, y K334A, usando la numeración Eu de los restos de la cadena pesada. Véase también la patente de EE.UU. nº 6.737.056B 1, Presta.

30 **[0147]** Cualquiera de estos anticuerpos puede comprender al menos una sustitución en la región Fc que mejora la unión FcRn o la semivida en el suero, por ejemplo, una sustitución en la posición 434 de la cadena pesada, tal como N434W. Véase también la patente de EE.UU. nº 6.737.056B1, Presta.

35 **[0148]** Cualquiera de estos anticuerpos puede comprender además al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que aumenta la actividad de CDC, por ejemplo, comprende al menos una sustitución en la posición 326, preferiblemente K326A o K326W. Véase también la patente de EE.UU. nº 6.528.624B 1 (Idusogie y col.).

40 **[0149]** Algunas variantes preferidas de 2H7 humanizado son las que comprenden el dominio ligero variable de la SEQ ID No. 26 y el dominio pesado variable de la SEQ ID No. 29, incluyendo aquellas con o sin sustituciones en una región Fc (si está presente) y las que comprenden un dominio pesado variable con la alteración N100A; o D56A y N100A; o D56A, N100Y, y S100aR; en la SEQ ID No. 29 y un dominio ligero variable con una alteración M32L; o S92A; o M32L y S92A; en la SEQ ID No. 26.

45 **[0150]** M34 en la cadena pesada variable de 2H7v16 se ha identificado como una fuente potencial de estabilidad de anticuerpos y es otro candidato potencial para la sustitución.

50 **[0151]** En un resumen de algunas de las diferentes realizaciones preferidas de la invención, la región variable de las variantes basadas en 2H7v16 comprende las secuencias de aminoácidos de v16 excepto en las posiciones de sustituciones de aminoácidos que están indicadas en la siguiente tabla. Salvo que se indique otra cosa, las variantes de 2H7 tienen la misma cadena ligera que la de v16.

Variantes del anticuerpo 2H7 humanizado de ejemplo

[0152]

Versión 2H7	Cambios de la cadena pesada (V _H)	Cambios de la cadena ligera (V _L)	Cambios de Fc
16 de referencia			–
31	–	–	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	–	–	K334L
588	–	–	S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A

[0153] Un 2H7 humanizado preferido comprende la secuencia del dominio ligero variable de 2H7v16:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFRSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No. 26);**

5

y la secuencia del dominio pesado variable de 2H7v16:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLIEWVGAIPGNGDTSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDVWGQGTLLTVSS (SEQ ID No. 29).**

10 **[0154]** Cuando el anticuerpo 2H7v16 humanizado es un anticuerpo intacto, puede comprender la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFRSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID No. 63);**

15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID No. 65 o:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLIEWVGAIPGNGDTSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFFLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID No. 71).**

20 **[0155]** Otro anticuerpo 2H7 humanizado preferido comprende la secuencia del dominio ligero variable de 2H7v511:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFRSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No. 73)**

y la secuencia del dominio pesado variable de 2H7v511:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAITYPGNGATSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWVGQGLVTVSS (SEQ ID No. 74).**

5 **[0156]** Cuando el anticuerpo 2H7v511 humanizado es un anticuerpo intacto, puede comprender la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSVSYLHWYQKPKGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID No. 64)**

10 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID No. 66 o:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAITYPGNGATSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWVGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAPIAA
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID No. 72).**

15 **[0157]** Un “tumor maligno de linfocitos B” en el presente documento incluye linfoma de no Hodgkin (NHL), incluyendo NHL de grado bajo/folicular, NHL linfocítico pequeño (SL), NHL de grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de grado alto, NHL linfoblástico de grado alto, NHL de células pequeñas no hendidas de grado alto, NHL de gran masa tumoral, linfoma de células del manto, linfoma relacionado con SIDA, y macroglobulinemia de Waldenstrom; leucemia, incluyendo leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), tricoleucemia y leucemia mieloblástica crónica; y otros tumores malignos hematológicos. Dichos tumores malignos se pueden tratar con anticuerpos dirigidos contra marcadores de superficie de linfocitos B, tales como CD20.

20 **[0158]** La expresión “linfoma de no Hodgkin” o “NHL”, como se usa en el presente documento, se refiere a un cáncer del sistema linfocítico distinto de los linfomas de Hodgkin. Los linfomas de Hodgkin se pueden distinguir en general de los linfomas de no Hodgkin por la presencia de células de Reed-Sternberg en los linfomas de Hodgkin y la ausencia de dichas células en los linfomas de no Hodgkin. Los ejemplos de linfomas de no Hodgkin abarcados por la expresión tal como se usa en el presente documento incluyen cualquiera que identificaría como tal un experto en la materia (p. ej., un oncólogo o patólogo) de acuerdo con los esquemas de clasificación conocidos en la materia, tales como la clasificación Revised European-American Lymphoma (REAL) como se describe en *Color Atlas of Clinical Hematology*, 3ª edición; A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Limited 2000) (véase, en particular Fig. 11.57, 11.58 y/o 11.59). Los ejemplos más específicos incluyen, pero no se limitan, NHL en recaída o refractarios, NHL de grado bajo de primera línea, NHL de fase III/IV, NHL resistente a quimioterapia, leucemia linfoblástica de linfocitos B precursores y/o linfoma, linfoma linfocítico pequeño, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B y/o leucemia prolinfocítica y/o linfoma linfocítico, linfoma prolinfocítico de linfocitos B, inmunocitoma y/o linfoma linfoplasmacítico, linfoma de linfocitos B de la zona marginal, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma extranodal de la zona marginal – MALT, linfoma nodal de la zona marginal nodal, tricoleucemia, plasmacitoma y/o mieloma de células plasmáticas, linfoma de grado bajo/folicular, NHL de grado intermedio/folicular, linfoma de células del manto, linfoma centrofolicular (folicular), NHL difuso de grado intermedio, linfoma difuso de linfocitos B grandes, NHL agresivo (incluyendo NHL de primera línea agresivo y NHL en recaída agresivo), recaída de NHL después o refractario al trasplante de citoblastos autólogos, linfoma de linfocitos B grandes mediastínico primario, linfoma de efusión primaria, NHL inmunoblástico de grado alto, NHL linfoblástico de grado alto, NHL de células pequeñas no hendidas de grado alto, NHL de gran masa tumoral, linfoma de Burkitt, leucemia y/o linfoma linfoblástico de linfocitos T precursores (periférico), linfoma y/o leucemia de linfocitos T del adulto, leucemia linfocítica crónica de linfocitos T y/o leucemia prolinfocítica, leucemia linfocítica granular grande, micosis fungoide y/o síndrome de Sézary, linfoma (tipo nasal) extranodal de linfocitos citolíticos naturales/T, linfoma de linfocitos T asociado a enteropatía, linfoma hepatoesplénico de linfocitos T, linfoma subcutáneo de linfocitos T de tipo paniculitis,

linfomas de piel (cutáneo), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma angiocéntrico, linfoma intestinal de linfocitos T, linfoma de linfocitos T periféricos (no especificado de otra forma) y linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico.

- 5 **[0159]** Una “enfermedad autoinmunitaria” en el presente documento es una enfermedad o trastorno que surge de y se dirige contra los propios tejidos del individuo o un cosegregado o manifestación de esta o afección resultante de la misma. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero sin limitar, artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide de inicio juvenil, osteoartritis, artritis psoriática y espondilitis anquilosante), psoriasis, dermatitis incluyendo dermatitis atópica, urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria crónica autoinmunitaria, polimiositis/dermatomiositis, necrosis epidérmica tóxica, esclerodermia (incluyendo esclerodermia sistémica), esclerosis tal como esclerosis sistémica progresiva, enfermedad inflamatoria del intestino (EII) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria autoinmunitaria del intestino), pioderma gangrenoso, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, epiescleritis), síndrome de dificultad respiratoria, incluyendo el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), meningitis, enfermedades mediadas por IgE tales como anafilaxia y rinitis alérgica y atópica, encefalitis tales como encefalitis de Rasmussen, uveítis o uveítis autoinmunitaria, colitis tal como colitis microscópica y colitis colagenosa, glomerulonefritis (GN) tal como GN membranosa (nefropatía membranosa), GN membranosa idiopática, GN membranoproliferativa (GNMP), incluyendo Tipo I y Tipo II, y GN rápidamente progresiva, afecciones alérgicas, reacciones alérgicas, eczema, asma, afecciones que implican la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus eritematoso sistémico (LES) tal como LES cutáneo, lupus eritematoso cutáneo subagudo, lupus (incluyendo nefritis, cerebritis, pediátrico, no renal, discoide, alopecia.), diabetes mellitus de inicio juvenil (Tipo I), incluyendo diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) pediátrica, diabetes mellitus de inicio en el adulto (diabetes tipo II), esclerosis múltiple (EM) tal como EM óptico-espinal, respuestas inmunitarias asociadas con la hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo vasculitis de vasos grandes (incluyendo polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de vasos medianos (incluyendo la enfermedad de Kawasaki y la poliarteritis nodosa), vasculitis del SNC, vasculitis necrotizante sistémica, y vasculitis asociada a ANCA, tales como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS)), arteritis temporal, anemia aplásica, anemia de Coombs positivo, anemia de Diamond-Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmunitaria incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AHA), anemia perniciosa, aplasia eritrocítica pura (APCR), deficiencia de factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapédesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de lesión multiorgánica, enfermedades mediadas por el complejo de antígeno-anticuerpo, enfermedad por anticuerpos contra la membrana basal glomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípido, neuritis alérgica, Bechet o enfermedad de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, síndrome Stevens-Johnson, penfigoide tal como penfigoide ampoloso, pénfigo (incluyendo pénfigo vulgar, foliáceo y de membranas mucosas), poliendocrinopatías autoinmunitarias, enfermedad de Reiter, nefritis por inmunocomplejos, neuropatía crónica tal como polineuropatías IgM o neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia (como la desarrollada por pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y trombocitopenia autoinmunitaria o inmunomediada tal como púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), incluyendo PTI crónica o aguda, enfermedad autoinmunitaria de testículos y ovario incluyendo orquitis y ovaritis autoinmunitaria, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades autoinmunitarias endocrinas incluyendo tiroiditis tales como tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto) o tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares tales como síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes de endocrinopatía poliglandulares), síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos tales como síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome del hombre rígido o persona rígida, encefalomiелitis tal como encefalomiелitis alérgica, miastenia grave, degeneración cerebelosa, encefalitis límbica y/o del tronco encefálico, neuromiotonía, síndrome de opsoclon o de opsoclon-mioclon (OMS), y neuropatía sensorial, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis crónica, hepatitis lupoides, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmunitaria, neumonitis intersticial linfoide, bronquiolitis obliterante (no de trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), cirrosis biliar primaria, celiaquía (enteropatía por gluten), esprúe refractario, dermatitis herpetiforme, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA, enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad arterial coronaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (AIED), o pérdida de la audición autoinmunitaria, síndrome de opsoclon-mioclon (OMS), policondritis tal como policondritis refractaria, proteinosis alveolar pulmonar, amiloidosis, hepatitis de células gigantes, escleritis, una linfocitosis no cancerosa, una linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis monoclonal de linfocitos B (p. ej., gammapatía monoclonal benigna y gammapatía monoclonal de significado incierto, GMSI), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías tal como epilepsia, migraña, arritmias, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica, y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, trastorno hepatológico autoinmunitario, fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes, síndrome de Dressler, alopecia areata, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud,

dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, espondilitis anquilosante, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón del granjero, eritema multiforme, síndrome post-cardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón de criadores de aves, síndrome de Alport, alveolitis tal como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, reacciones transfusionales, lepra, malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmítis, eritema elevado persistente, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flarisis, ciclitis tales como ciclitis crónica, ciclitis heterocrómica o ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schönlein, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), infección por echovirus, cardiomiopatía, enfermedad de Alzheimer, infección por parvovirus, infección por virus de la rubéola, síndromes posteriores a la vacunación, infección de rubéola congénita, infección por el virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, insuficiencia gonadal autoinmunitaria, corea de Sydenham, nefritis postestreptocócica, tromboangeítis obliterante, tirotoxicosis, tabes dorsal, y polimialgia de células gigantes.

[0160] La "superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral" o "superfamilia de receptores de TNF" en el presente documento se refiere a polipéptidos receptores unidos por citoquinas en la familia del TNF. En general, estos receptores son receptores transmembrana de tipo I con una o más secuencias que se repiten ricas en cisteína en su dominio extracelular. La superfamilia de receptores de TNF se puede subdividir además en (1) receptores de muerte; (2) receptores simulados; y (3) receptores de señalización que carecen de dominios de muerte. Los "receptores de muerte" contienen en su región citoplasmática o intracelular un "dominio de muerte", es decir una región o secuencia que actúa para transducir señales en la célula que pueden dar como resultado la apoptosis o la inducción de determinados genes. Los "receptores simulados" carecen de un dominio de muerte funcional y no son capaces de transducir señales que den como resultado la apoptosis. Los ejemplos de citoquinas en la familia de genes del TNF incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), factor de necrosis tumoral beta (TNF-beta o linfoxina), ligando CD30, ligando CD27, ligando CD40, ligando OX-40, ligando 4-1 BB, ligando Apo-1 (también denominado ligando Fas o ligando CD95), ligando Apo-2 (también denominado TRAIL), ligando Apo-3 (también denominado TWEAK), osteoprotegerina (OPG), APRIL, ligando RANK (también denominado TRANCE), y TALL-1 (también denominado BlyS, BAFF o THANK). Los ejemplos de receptores en la superfamilia de receptores de TNF incluyen: receptor del factor de necrosis tumoral de tipo 1 (TNFR1), receptor del factor de necrosis tumoral de tipo 2 (TNFR2), receptor del factor de crecimiento nervioso p75 (NGFR), el antígeno de superficie de linfocitos B CD40, el antígeno de linfocitos T OX-40, receptor Apo-1 (también llamado Fas o CD95), receptor Apo-3 (también llamado DR3, swl-1, TRAMP y LARD), el receptor llamado "proteína activadora de transmembrana e interactiva del CALM" o "TACI", proteína BCMA, DR4, DR5 (denominada alternativamente Apo-2; TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER), DR6, DcR1 (también denominado TRID, LIT o TRAIL-R3), DcR2 (también denominado TRAIL-R4 o TRUND), OPG, DcR3 (también denominado TR6 o M68), CAR1, HVEM (también denominado ATAR o TR2), GITR, ZTNFR-5, NTR-1, TNFL1, CD30, receptor de linfoxina beta (LTBr), receptor 4-1BB y TR9 (EP988 371A1).

[0161] Las expresiones "ligando Apo-2", "Apo-2L", "Apo2L", "ligando Apo-2/TRAIL" y "TRAIL" se usan en el presente documento de forma intercambiable para referirse a una secuencia de polipéptido que incluye los restos de aminoácidos 114 – 281 inclusive, 95 – 281 inclusive, restos 92 – 281 inclusive, restos 91 – 281 inclusive, restos 41 – 281 inclusive, restos 39 – 281 inclusive, restos 15 – 281 inclusive, o restos 1 – 281, inclusive, o la secuencia de aminoácidos mostrada en la Fig. 24 (SEQ ID No. 46), así como fragmentos biológicamente activos, variantes por eliminación, inserción y/o sustitución de las secuencias anteriores. En una realización, la secuencia de polipéptido comprende los restos 114 – 281 de la Fig. 24 (SEQ ID No. 46). Opcionalmente, la secuencia de polipéptido comprende los restos 92 – 281 o los restos 91 – 281 de la Fig. 24 (SEQ ID No. 46). Los polipéptidos Apo-2L pueden ser codificados por la secuencia de nucleótidos nativa mostrada en la Fig. 24 (SEQ ID No. 45). Opcionalmente, el codón que codifica el resto Pro119 (Fig. 24; SEQ ID No. 45) puede ser "CCT" o "CCG". Opcionalmente, los fragmentos o variantes son biológicamente activos y tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80 %, o una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 90 %, o una identidad de secuencia de al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con cualquiera de las secuencias anteriores. La definición abarca variantes por sustitución del ligando Apo-2 en las que al menos uno de sus aminoácidos naturales se sustituye por otro aminoácido tal como un resto de alanina. La definición también abarca una secuencia natural del ligando Apo-2 aislada de una fuente del ligando Apo-2 o preparada por procedimientos recombinantes y/o sintéticos. El ligando Apo-2 de la invención incluye los polipéptidos denominados ligando Apo-2 o TRAIL descritos en los documentos WO97/01633 publicado el 16 de enero, 1997, WO97/25428 publicado el 17 de julio, 1997, WO99/36535 publicado el 22 de julio, 1999, WO 01/00832 publicado el 4 de enero, 2001, WO02/09755 publicado el 7 de febrero, 2002, WO 00/75191 publicado el 14 de diciembre, 2000, y patente de EE.UU. nº 6.030.945 concedida el 29 de febrero, 2000. Las expresiones se usan para referirse en general a formas del ligando Apo-2 que incluyen formas de monómero, dímero, trímero, hexámero u oligómero superior del polipéptido. Todas las numeraciones de restos de aminoácidos a las que se ha hecho referencia en la secuencia de Apo-2L usan la numeración de acuerdo con la Fig. 24 (SEQ ID No. 46), salvo que se establezca específicamente de otra forma.

[0162] El "receptor del ligando Apo-2" incluye los receptores denominados en la materia "DR4" y "DR5". Pan y col. han descrito el miembro de la familia de receptores de TNF denominado "DR4" (Pan y col., *Science*, 276: 111 – 113

(1997); véase también los documentos WO98/32856 publicado el 30 de julio, 1998; WO 99/37684 publicado el 29 de julio, 1999; WO 00/73349 publicado el 7 de diciembre, 2000; US 6.433.147 concedido el 13 de agosto, 2002; US 6.461.823 concedido el 8 de octubre, 2002, y US 6.342.383 concedido el 29 de enero, 2002). Sheridan y col., *Science*, 277: 818 – 821 (1997) y Pan y col., *Science*, 277: 815 – 818 (1997) describieron otro receptor para Apo2L/TRAIL (véase también los documentos WO98/51793 publicado el 19 de noviembre, 1998; documento WO98/41629 publicado el 24 de septiembre, 1998). Este receptor se denomina DR5 (el receptor también se ha denominado alternativamente Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER; Sreaton y col., *Curr. Biol.*, 7: 693 – 696 (1997); Walczak y col., *EMBO J.*, 16: 5386 – 5387 (1997); Wu y col., *Nature Genetics*, 17: 141 – 143 (1997); documentos WO98/35986 publicado el 20 de agosto, 1998; EP870827 publicado el 14 de octubre, 1998; WO98/46643 publicado el 22 de octubre, 1998; WO99/02653 publicado el 21 de enero, 1999; documento WO99/09165 publicado el 25 de febrero, 1999; documento WO99/11791 publicado el 11 de marzo, 1999; US 2002/0072091 publicado el 13 de agosto, 2002; US 2002/0098550 publicado el 7 de diciembre, 2001; US 6,313.269 concedido el 6 de diciembre, 2001; US 2001/0010924 publicado el 2 de agosto, 2001; US 2003/01255540 publicado el 3 de julio, 2003; US 2002/0160446 publicado el 31 de octubre, 2002, US 2002/0048785 publicado el 25 de abril, 2002; US 6.569.642 concedido el 27 de mayo, 2003, US 6,072,047 concedido el 6 de junio, 2000, US 6.642.358 concedido el 4 de noviembre, 2003). Como se ha descrito antes, otros receptores para Apo-2L incluyen DcR1, DcR2 y OPG. La expresión “receptor de Apo-2L” cuando se usa en el presente documento abarca el receptor de secuencia natural y variantes del receptor. Estos términos abarcan el receptor de Apo-2L expresado en una variedad de mamíferos, incluyendo seres humanos. El receptor de Apo-2L puede ser expresado de forma endógena como ocurre de forma natural en una variedad de linajes de tejidos humanos, o se puede expresar por procedimientos recombinantes o sintéticos. Un “receptor de Apo-2L de secuencia natural” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un receptor de Apo-2L derivado de la naturaleza. Por lo tanto, una secuencia natural del receptor de Apo-2L puede tener la secuencia de aminoácidos del receptor de Apo-2L natural de cualquier mamífero, incluyendo seres humanos. Dicho receptor de Apo-2L de secuencia natural se puede aislar de la naturaleza o se puede producir por medios sintéticos o recombinantes. La expresión “receptor de Apo-2L de secuencia natural” abarca específicamente formas truncadas o secretadas naturales del receptor (p. ej., una forma soluble que contiene, por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes naturales (p. ej., formas de empalme alternativo) y variantes alélicas naturales. Las variantes del receptor pueden incluir fragmentos o mutantes por eliminación del receptor de Apo-2L de secuencia natural. Las figuras 25A – C muestra la secuencia de 411 aminoácidos del receptor DR5 humano, junto con su secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nos. 47 y 48) publicado en el documento WO 98/51793 el 19 de noviembre, 1998. Se conoce una variante por empalme transcripcional del receptor DR5 humano. Esta variante por empalme codifica la secuencia de 440 aminoácidos del receptor DR5 humano como se muestra en las Figs. 26A – C, junto con su secuencia de nucleótidos (SEQ ID Nos. 49 y 50), y publicado en el documento WO 98/35986 el 20 de agosto, 1998.

[0163] El “anticuerpo contra el receptor de muerte” como se usa en el presente documento se refiere en general a un anticuerpo o anticuerpos dirigidos contra un receptor en la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y que contiene un dominio de muerte capaz de señalar apoptosis, y dichos anticuerpos incluyen el anticuerpo DR5 y el anticuerpo DR4.

[0164] “Anticuerpo contra el receptor DR5”, “anticuerpo DR5” o “anticuerpo dirigido contra DR5” se usan en un sentido amplio para referirse a anticuerpos que se unen a al menos una forma del receptor DR5 o el dominio extracelular del mismo. Opcionalmente, el anticuerpo DR5 se fusiona o se une a una secuencia heteróloga o molécula. Preferiblemente, la secuencia heteróloga permite o ayuda al anticuerpo a formar complejos oligómeros o de orden superior. Opcionalmente, el anticuerpo DR5 se une al receptor DR5 pero no se une ni reacciona de forma cruzada con ningún receptor de Apo-2L adicional (p. ej. DR4, DcR1 o DcR2). Opcionalmente, el anticuerpo es un agonista de la actividad de señalización de DR5.

[0165] Opcionalmente, el anticuerpo DR5 de la invención se une a un receptor DR5 en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 20 mM medido en un ensayo de unión de BIAcore. Opcionalmente, los anticuerpos DR5 de la invención presentan un valor de CI50 de aproximadamente 0,6 nM a aproximadamente 18 mM, medido en un ensayo de unión de BIAcore.

[0166] Solo para los propósitos del presente documento, el término “Apomab” se refiere a un anticuerpo agonista que se une a DR5 y comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada variable y ligera variable de las SEQ ID Nos. 55 y 56. Preferiblemente, Apomab comprende las cadenas pesada y ligera de las SEQ ID Nos. 51 y 52, respectivamente.

II. Producción de anticuerpos

[0167] A continuación se describen las técnicas para producir anticuerpos para preparar formulaciones de acuerdo con la presente invención.

(i) Selección y preparación de antígenos

[0168] Preferiblemente, el antígeno al que se une el anticuerpo es una glicoproteína biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede producir un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también están contemplados los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glicolípidos asociados a tumor; véase la patente de EE.UU. nº 5.091.178).

[0169] Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula de transmembrana (p. ej., receptor) o ligando tal como un factor de crecimiento. Los antígenos de ejemplo incluyen moléculas tales como renina; una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor de liberación de hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimuladora de tiroides; lipoproteínas; alfa 1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como el factor VIIIc, factor IX, factor tisular (TF) y factor de von Willebrands; factores anticoagulantes tales como Proteína C; factor natriurético atrial; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (linfocitos T normales expresados y secretados, regulados tras activación); proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1-alfa); una albúmina del suero tal como albúmina del suero humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como la beta-lactamasa; DNasa; IgE; antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF-b; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-b1, TGF-b2, TGF-b3, TGF-b4, o TGF-b5; un factor de necrosis tumoral (TNF) tal como TNF-alfa o TNF-beta; factor de crecimiento de tipo insulina-I y -II (IGF-I y IGF-II); des (1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebral), proteínas que se unen al factor de crecimiento de tipo insulina; proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22 y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón-alfa, -beta, y -gamma; factores estimuladores de colonias (CSF), p. ej., M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleuquinas (IL), p. ej., IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 e IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de superficie de membrana; factor acelerante del decaimiento; antígenos víricos tales como, por ejemplo, una parte de la envuelta del virus del SIDA; proteínas transportadoras; receptores de asentamiento; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos listados antes.

[0170] Las dianas moleculares de ejemplo para los anticuerpos abarcados por la presente invención incluyen proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34 y CD40; miembros de la familia de receptores ErbB tales como el receptor EGF, receptor HER2, HER3 o HER4; antígenos de superficie de linfocitos B, tales como CD20 o BR3; un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, incluyendo DR5; antígeno de citoblastos prostáticos (PSCA); moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina alfa4/beta7, e integrina alfa/beta3 incluyendo sus subunidades alfa o beta (p. ej. anticuerpos dirigidos contra CD11a, contra CD18 o contra CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF así como sus receptores; factor tisular (TF); un factor de necrosis tumoral (TNF) tal como TNF-alfa o TNF-beta, interferón alfa (alfa-IFN); una interleuquina, tal como IL-8; IgE; antígenos del grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; proteína C, etc.

[0171] Los antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, se pueden usar como inmunógenos para generar anticuerpos. Para las moléculas de transmembrana, tales como receptores, se pueden usar fragmentos de estos (p. ej., el dominio extracelular de un receptor) como el inmunógeno. Alternativamente, se pueden usar como el inmunógeno las células que expresan la molécula de transmembrana. Dichas células se pueden obtener de una fuente natural (p. ej., líneas de células de cáncer) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula de transmembrana. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia.

[0172] Para la producción de los anticuerpos contra HER2, el antígeno HER2 que se va a usar para su producción puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de HER2 o una parte del mismo, que contiene el epítipo deseado. Alternativamente, se pueden usar las células que expresan HER2 en su superficie celular (p. ej., células NIH-3T3 transformadas para la expresión en exceso de HER2; o una línea celular de carcinoma tal como células SK-BR-3, véase Stancovski y col. *PNAS* (USA) 88: 8691 – 8695 (1991)), para generar los anticuerpos.

(ii) *Anticuerpos monoclonales*

[0173] Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto para posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal. Por lo tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos.

[0174] Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., *Nature*, 256: 495 (1975), o se puede preparar por procedimientos de ADN recombinante (patente de EE.UU. nº 4.816.567).

[0175] En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal huésped adecuado, tal como un hámster se inmuniza como se ha descrito en lo que antecede para hacer que los linfocitos produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro. Después los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59 – 103 (Academic Press, 1986)).

[0176] Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

[0177] Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan niveles de producción altos estables del anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre estas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE.UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en The American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EE.UU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humanas y de heteromieloma de ratón-humanas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); y Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas. 51 – 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0178] Se ensaya en el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de la unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA).

[0179] La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, por análisis de Scatchard de Munson y col., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

[0180] Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar por procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59 – 103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar in vivo como tumores ascíticos en un animal.

[0181] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, el líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía con hidroxipatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

[0182] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej. usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado el ADN se puede poner en vectores de expresión, que después se transfectan a células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 – 262 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 – 188 (1992).

[0183] En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas anticuerpos en fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*, 348: 552 – 554 (1990). Clackson y col., *Nature*, 352: 624 – 628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 – 597 (1991)

describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante barajado de cadena (Marks y col., *Bio/Technology*, 10: 779 – 783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación in vivo como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265 – 2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales del hibridoma de anticuerpo monoclonal para aislar anticuerpos monoclonales.

[0184] También se puede modificar el ADN, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de la cadena pesada y la cadena ligera humanas por las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Morrison, y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), o por unión covalente a la secuencia que codifica la inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia que codifica un polipéptido no inmunoglobulínico.

[0185] Normalmente, dichos polipéptidos no inmunoglobulínicos se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación del antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación del antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación del antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

(ii) *Anticuerpos humanizados*

[0186] Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanizados se han descrito en la materia. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos “importados”, que típicamente se toman de un dominio variable “importado”. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321: 522 – 525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323 – 327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239: 1534 – 1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. nº 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de la FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0187] La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usarlos para preparar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento llamado “de mejor ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se selecciona frente a la biblioteca entera de secuencias de dominios variables humanos conocidos. La secuencia humana que es la más cercana a la de roedor, se acepta entonces como la región armazón humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia y col., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro procedimiento usa una región armazón particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede usar la misma región armazón para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

[0188] Es importante además, que los anticuerpos se humanicen con retención de la afinidad alta por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un procedimiento preferido, se preparan anticuerpos humanizados por un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diferentes productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están normalmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de la función probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, se pueden seleccionar y combinar los restos de la FR del receptor e importar secuencias de modo que se logren las características del anticuerpo deseadas, tales como mayor afinidad para el o los antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están directa y sustancialmente más implicados en la influencia de unión del antígeno.

[0189] El documento WO01/00245 describe la producción de anticuerpos contra HER2 humanizados de ejemplo que se unen a HER2 y bloquean la activación del ligando de un receptor HER. El anticuerpo humanizado de interés particular en el presente documento, bloquea la activación mediada por EGF, TGF- α y/o HRG de MAPK esencialmente de forma tan eficaz como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 (o un fragmento Fab del mismo) y/o se une a HER2 esencialmente de forma tan eficaz como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 (o un fragmento Fab del mismo). El anticuerpo humanizado del presente documento puede comprender, por ejemplo, restos de la región hipervariable no humana incorporados en un dominio pesado variable humano y puede comprender además una

sustitución de la región armazón (FR) en una posición seleccionada del grupo que consiste en 69H, 71H y 73H, utilizando el sistema de numeración del dominio variable establecido en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de la FR en dos o en todas las posiciones de 69H, 71H y 73H.

[0190] Un anticuerpo humanizado de ejemplo de interés en el presente documento comprende restos determinantes de la complementariedad del dominio pesado variable GFTFTDYTMX, en el que X es preferiblemente D o S (SEQ ID No. 7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID No. 8); y/o NLGSPSYFDY (SEQ ID No. 9), que comprende opcionalmente modificaciones de aminoácidos de aquellos restos de la CDR, por ejemplo, en las que las modificaciones mantienen esencialmente o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante del anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente 1 a aproximadamente 7 o aproximadamente 5 sustituciones de aminoácidos en las secuencias anteriores de CDR pesadas variables anteriores. Dichas variantes de anticuerpo se pueden preparar por maduración de afinidad, por ejemplo, como se describe más adelante. El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia de aminoácidos del dominio pesado variable de la SEQ ID No. 4.

[0191] El anticuerpo humanizado puede comprender los restos determinantes de la complementariedad del dominio ligero variable KASQDVSIGVA (SEQ ID No. 10); SASYXXX, en el que X como posición 5 es preferiblemente R o L, en el que X en la posición 6 es preferiblemente Y o E, y X en la posición 7 es preferiblemente T o S (SEQ ID No. 11); y/o QQQYYIPLYT (SEQ ID No. 12), p. ej. además de los restos de la CDR del dominio pesado variable del párrafo precedente. Dichos anticuerpos humanizados comprenden opcionalmente modificaciones de aminoácidos de los restos de la CDR anteriores, por ejemplo, en los que las modificaciones mantienen esencialmente o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo de interés puede obtener de aproximadamente 1 a aproximadamente 7 o aproximadamente 5 sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR ligeras variables anteriores. Dichas variantes de anticuerpo se pueden preparar por maduración de afinidad, por ejemplo, como se describe más adelante. El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia de aminoácidos del dominio ligero variable de la SEQ ID No. 3.

[0192] La presente solicitud también contempla anticuerpos de afinidad maduros que se unen a HER y bloquean la activación del ligando de un receptor HER. El anticuerpo original puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, por ejemplo uno que comprende las secuencias variables pesada y/o ligera de las SEQ ID Nos. 3 y 4, respectivamente (es decir, variante 574). El anticuerpo de afinidad maduro preferiblemente se une al receptor HER2 con una afinidad superior a la del murino 2C4 o variante 574 (p. ej., de aproximadamente 2 o aproximadamente 4 veces a aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1000 veces mejor la afinidad, p. ej., evaluada usando un dominio extracelular de HER-2 (ECD) ELISA). Los restos de la CDR pesada variable de ejemplo para sustitución incluyen H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, o combinaciones de dos o más (p. ej. 2, 3, 4, 5, 6, o 7 de estos restos). Los ejemplos de los restos de la CDR ligera variable para alterar incluyen L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 o combinaciones de dos o más (p. ej. de 2 a 3, 4, 5 o hasta aproximadamente 10 de estos restos).

[0193] Se contemplan diferentes formas de anticuerpo humanizado o anticuerpo de afinidad maduro. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o anticuerpo de afinidad maduro puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está opcionalmente conjugado con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunocóncugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado o anticuerpo de afinidad maduro puede ser un anticuerpo de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG1 de longitud completa.

(iv) Anticuerpos humanos

[0194] Como una alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora se pueden producir animales transgénicos (p. ej., ratones) que tras inmunización son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (J_H) del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana a dichos ratones mutantes de la línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación del antígeno. Véase, p. ej., Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362: 255 – 258 (1993); Bruggermann y col., *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); y patentes de EE.UU. nº 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

[0195] Alternativamente, se puede usar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty y col., *Nature* 348: 552 – 553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo in vitro, a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en el marco en un gen de proteína de recubrimiento mayoritario o minoritario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo

funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia del ADN de una cadena del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por lo tanto, el fago mimetiza algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos se puede llevar a cabo en una variedad de formatos; para una revisión véase, p. ej., Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564 – 571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos del gen V para la presentación en fagos. Clackson y col., *Nature*, 352: 624 – 628 (1991) aislaron un conjunto diverso de anticuerpos dirigidos contra la oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V obtenidos de bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar los anticuerpos contra un conjunto diverso de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222: 581 – 597 (1991), o Griffith y col., *EMBO J.* 12: 725 – 734 (1993). Véanse también las patentes de EE.UU. nº 5.565.332 y 5.573.905.

[0196] Como se ha discutido antes, los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante linfocitos B activados in vitro (véanse las patentes de EE.UU. nº 5.567.610 y 5.229.275).

[0197] Los anticuerpos contra HER2 humano se describen en la patente de EE.UU. nº 5.772.997 concedida el 30 de junio, 1998 y el documento WO 97/00271 publicado el 3 de enero, 1997.

(v) Fragmentos de anticuerpo

[0198] Se han desarrollado diferentes técnicas para producir fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían por digestión proteolítica de anticuerpos de longitud completa (véase, p. ej., Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107 – 117 (1992); y Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, se pueden aislar los fragmentos de anticuerpo de bibliotecas de anticuerpos en fagos descritas antes.

[0199] Alternativamente, se pueden recuperar fragmentos Fab'-SH directamente de *E. coli* y acoplarlos químicamente para formar fragmentos F (ab')₂ (Carter y col., *Biotechnology* 10: 163 – 167 (1992)). De acuerdo con otro procedimiento, se pueden aislar fragmentos F (ab')₂ directamente de un cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de una cadena (scFv). Véase el documento WO 93/16185; patente de EE.UU. nº 5.571.894; y patente de EE.UU. nº 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser mono-específicos o biespecíficos.

(vi) Anticuerpos biespecíficos

[0200] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidad de unión para al menos 2 epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes de la proteína HER2. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a HER2 con uno o más sitios de unión para EGFR, HER3 y/o HER4. Alternativamente, se puede combinar un brazo de HER2 con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de linfocito T (p. ej. CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para así centrar los mecanismos de defensa celular contra la célula que expresa HER-2. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos para las células que expresan HER-2. Estos anticuerpos tienen un brazo de unión a HER-2 y un brazo que se une al agente citotóxico (p. ej., saporina, anti-interferón α, alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (p. ej., anticuerpos biespecíficos F (ab')₂).

[0201] El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico HER2/FcγRIII y la patente de EE.UU. nº 5.837.234 describe un anticuerpo biespecífico HER2/FcγRI IDM1 (Osidem). Se muestra un anticuerpo biespecífico HER2/Fcα en el documento WO98/02463. La patente de EE.UU. nº 5.821.337 enseña un anticuerpo biespecífico HER2/CD3. MDX-210 es un anticuerpo biespecífico HER2-FcγRIII.

[0202] Se conocen en la materia procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferente especificidad (Millstein y col., *Nature*, 305: 537 – 539 (1983)). Debido al conjunto aleatorio de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, lo cual se hace habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante dificultosa y el rendimiento del producto es bajo. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Trauneker y col., *EMBO J.*, 10: 3655 – 3659 (1991).

[0203] De acuerdo con un procedimiento diferente, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) con secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan conjuntamente en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los 3 fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que proporciones desiguales de las 3 cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, se pueden insertar las secuencias codificantes de dos o de las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión, cuando la expresión de al menos 2 cadenas de polipéptidos en proporciones iguales produce rendimientos altos o cuando las proporciones no tienen una importancia particular.

[0204] En una realización preferida de este procedimiento, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo de separación fácil. Este procedimiento se describe en el documento WO 94/04690. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

[0205] De acuerdo con otro procedimiento descrito en la patente de EE.UU. nº 5.731.168, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recupera del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales mayores (p. ej., tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la o las cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo al sustituir las cadenas laterales grandes de aminoácidos por unas más pequeñas (p. ej., alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

[0206] Los anticuerpos específicos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar con avidina, y el otro con biotina. Se ha propuesto que dichos anticuerpos, por ejemplo, dirijan las células del sistema inmunitario contra células no deseadas (Patente de EE.UU. nº 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden hacer usando cualquiera de los procedimientos de recirculación convenientes. Los agentes de recirculación adecuados son bien conocidos en la materia y se describen en la patente de EE.UU. nº 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

[0207] También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando enlaces químicos. Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos de longitud completa son escindidos de forma proteolítica para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación complejante de ditiol arsenito sódico, para estabilizar ditiolos vecinales y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados después se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Después, se reconvierte uno de los derivados de Fab-TNB en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0208] El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.*, 175: 217 – 225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento Fab' era segregado por separado por *E. coli* y sometido a acoplamiento químico directo in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado era capaz de unirse a células que expresaban en exceso el receptor HER2 y a linfocitos T humanos normales, así como de desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano. También se han descrito diferentes técnicas para hacer y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148 (5): 1547 – 1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar

los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también se puede usar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de los "fragmentos divalentes" descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444 – 6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento son forzados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión al antígeno. También se ha descrito otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de una cadena (sFv). Véase, Gruber y col., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

[0209] Están contemplados los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos Tutt y col. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) Otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos

[0210] La o las modificaciones de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento están contempladas. Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se hace para llegar a la construcción final, con la condición de la que la construcción final tenga las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo, tal como cambiando el número o la posición de los sitios de glicosilación.

[0211] Un procedimiento útil para identificar determinados restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" descrito por Cunningham y Wells *Science*, 244: 1081 – 1085 (1989). Aquí, un resto o grupo de restos diana son identificados (p. ej., restos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y sustituidos por un aminoácido neutro o con carga negativa (lo más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Después, aquellas posiciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones son refinadas introduciendo variantes adicionales u otras variantes en o para los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la propia naturaleza de la mutación no tiene que estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo la mutagénesis de barrido con ala o aleatoria en el codón o región diana y se seleccionan las variantes de anticuerpos expresadas de acuerdo con la actividad deseada.

[0212] Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían de longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones dentro de la secuencia de uno o múltiples restos de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo, un resto metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión en el extremo N o C del anticuerpo a una enzima (p. ej., para ADEPT) o un polipéptido, lo cual aumenta la semivida en el suero del anticuerpo.

[0213] Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituido por un resto diferente. Los sitios que tienen mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también están contempladas las alteraciones de las regiones FR o Fc. Las sustituciones conservativas se muestran en la tabla 1 bajo el encabezamiento "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio de la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones de ejemplo" en la tabla 1, o como se describe con más detalle a continuación con referencia a las clases de aminoácidos, y seleccionar los productos.

Tabla 1

Resto original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

[0214] Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se llevan a cabo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento (a) de la estructura de la cadena principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, 2ª ed., página. 73 – 75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H).

[0215] Alternativamente, los restos naturales se pueden dividir en grupos basándose en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[0216] Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

[0217] También se puede sustituir cualquier resto de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación adecuada del anticuerpo, en general por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación aberrante. A la inversa, se pueden añadir un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (en particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

[0218] Un tipo particularmente preferido de variantes por sustitución implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la o las variantes resultantes seleccionadas para el posterior desarrollo tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo original a partir del cual se generan. Una forma conveniente de generar dichas variantes por sustitución, implica la maduración de la afinidad usando presentación en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de la región hipervariable (p. ej. 6 – 7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácido en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se presentan de una forma monovalente en las partículas de fago filamentosas como fusiones al producto génico III de M13 empaquetada con cada partícula. Las variantes presentadas en fago después se seleccionan de acuerdo con su actividad biológica (p. ej., afinidad de unión) como

se describe en el presente documento. Con el fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar la mutagénesis por barrido de alanina para identificar los restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. Alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y su antígeno. Dichos restos de contacto y los restos vecinos son candidatos para la sustitución, de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se han generado dichas variantes, el panel de variantes se somete a selección como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes, para el posterior desarrollo.

[0219] Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por alterar se entiende eliminar uno o más restos de hidratos de carbono encontrados en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

[0220] La glicosilación de los anticuerpos es típicamente unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más habitualmente serina o treonina, aunque también se puede usar hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[0221] La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se lleva a cabo de forma conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas antes (para los sitios de glicosilación unidos a N). La alteración también se puede hacer por la adición o sustitución por uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (sitios de glicosilación unidos a O).

[0222] Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el hidrato de carbono unido al mismo se puede alterar. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de hidrato de carbono madura que carecen de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo, se describen en la solicitud de patente de EE.UU. US 2003/0157108 A1, Presta, L. Véase también el documento US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) que biseca en el hidrato de carbono unido a una región Fc del anticuerpo se citan en el documento WO03/011878, Jean-Mairet y col. y la patente de EE.UU. nº 6.602.684, Umana y col. Los anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se describen en el documento WO97/30087, Patel y col. Véase, también los documentos WO98/58964 (Raju, S.) y WO99/22764 (Raju, S.) en relación con anticuerpos con el hidrato de carbono alterado unido a su región Fc. Las composiciones de anticuerpos que comprenden el anticuerpo de la especie principal con dichas estructuras de hidrato de carbono unidas a la región Fc también se contemplan en el presente documento.

[0223] Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan por una variedad de procedimientos conocidos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitar, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de la secuencia de aminoácidos natural) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

(vii) Selección de anticuerpos con las propiedades deseadas

[0224] Las técnicas para generar anticuerpos se han descrito antes. Se pueden seleccionar además anticuerpos con determinadas características biológicas según se desee.

[0225] Para identificar un anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER, se puede determinar la capacidad del anticuerpo para bloquear la unión del ligando del HER a células que expresan el receptor HER (p. ej., en combinación con otro receptor HER con el que el receptor HER de interés forma un heterooligómero de HER). Por ejemplo, las células que expresan de forma natural, o transfectadas para que expresen, receptores HER del heterooligómero de HER se pueden incubar con el anticuerpo y después exponer al ligando de HER marcado. Después se puede evaluar la capacidad del anticuerpo contra HER2 para bloquear la unión del ligando al receptor HER en el heterooligómero de HER.

[0226] Por ejemplo, la inhibición de la unión de HRG a las líneas celulares de tumor de mama MCF7 por los anticuerpos contra HER2 se puede realizar usando cultivos de MCF7 monocapa sobre hielo en un formato de placa de 24 pocillos, esencialmente como se describe en el documento WO01/00245. Se pueden añadir anticuerpos monoclonales contra HER2 a cada pocillo e incubarlos durante 30 min. Después se puede añadir rHRG β ₁₇₇₋₂₂₄ marcado con ¹²⁵I (25 pm) y se puede continuar la incubación durante 4 a 16 h. Se pueden preparar curvas de

respuesta a la dosis y se puede calcular un valor de CI_{50} para el anticuerpo de interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá una CI_{50} para inhibir la unión de HRG a las células MCF7 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferiblemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la CI_{50} para inhibir la unión de HRG a las células MCF7 en este ensayo puede ser, por ejemplo, aproximadamente 100 nM o menos, más preferiblemente 50 nM o menos.

[0227] Alternativa o adicionalmente, se puede evaluar la capacidad del anticuerpo contra HER2 para bloquear la fosforilación de tirosina estimulada por el ligando de HER de un receptor HER presente en un heterooligómero de HER. Por ejemplo, las células que expresan de forma endógena los receptores HER o transfectadas para expresarlos, se pueden entonces incubar con el anticuerpo y después ensayar la actividad de fosforilación de tirosina dependiente del ligando de HER usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la fosfotirosina (que está opcionalmente conjugado con un marcador detectable). También está disponible el ensayo de la activación de receptor de quinasa descrito en la patente de EE.UU. nº 5.766.863, para determinar la activación del receptor HER y bloquear esta actividad por un anticuerpo.

[0228] Se puede seleccionar un anticuerpo que inhiba la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina p180 en células MCF7 esencialmente como se describe en el documento WO01/00245. Por ejemplo, se pueden cultivar las células MCF7 en placas de 24 pocillos y se pueden añadir anticuerpos monoclonales contra HER2 a cada pocillo e incubar durante 30 min a temperatura ambiente; después se puede añadir rHRG $\beta_{1177-224}$ a cada pocillo hasta una concentración fina 0,2 nM, y se puede continuar la incubación durante 8 min. Se puede aspirar el medio de cada pocillo, y se pueden detener las reacciones por la adición de 100 μ l de tampón de muestra de SDS (SDS al 5 %, DTT 25 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25 μ l) se puede tratar por electroforesis en un gel en gradiente de 4 – 12 % (Novex) y después transferir electroforéticamente a membrana de poli (difluoruro de vinilideno). Se pueden desarrollar inmunotransferencias dirigidas contra fosfotirosina (con 1 μ g/ml), y se puede cuantificar la intensidad de la banda de reactivo predominante con $M_r \sim 180.000$ por densitometría de reflexión. El anticuerpo seleccionado inhibirá preferiblemente de forma significativa la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina p180 a aproximadamente 0 – 35 % del control en este ensayo. Se puede preparar una curva de respuesta a la dosis para la inhibición de la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina p180, determinada por densitometría de reflexión, y se puede calcular una CI_{50} para el anticuerpo de interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá una CI_{50} para la inhibición de la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina p180 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferiblemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la CI_{50} para la inhibición de la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina p180 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menos, más preferiblemente 50 nM o menos.

[0229] También se pueden evaluar los efectos inhibidores del crecimiento del anticuerpo en las células MDA-MB-175, p. ej., esencialmente como se describe en Schaefer y col. *Oncogene* 15: 1385 – 1394 (1997). De acuerdo con este ensayo, las células MDA-MB-175 se pueden tratar con un anticuerpo monoclonal contra HER2 (10 μ g/ml) durante 4 días y después teñir con cristal violeta. La incubación con un anticuerpo contra HER2 puede mostrar un efecto inhibidor del crecimiento en esta línea celular similar al presentado por el anticuerpo monoclonal 2C4. En una realización adicional, la HRG exógena no invertirá de forma significativa esta inhibición. Preferiblemente, el anticuerpo será capaz de inhibir la proliferación celular de las células MDA-MB-175 en una mayor extensión que el anticuerpo monoclonal 4D5 (y opcionalmente en una mayor extensión que el anticuerpo monoclonal 7F3), ambos en presencia y ausencia de HRG exógena.

[0230] El anticuerpo contra HER2 de interés puede bloquear la asociación dependiente de heregulina de HER2 con HER3 tanto en células MCF7 como SK-BR-3, determinado en un experimento de inmunoprecipitación conjunta tal como el descrito en el documento WO011/00245, sustancialmente de forma más eficaz que el anticuerpo monoclonal 4D5, y preferiblemente sustancialmente de forma más eficaz que el anticuerpo monoclonal 7F3.

[0231] Para identificar los anticuerpos contra HER2 inhibidores del crecimiento, se pueden seleccionar anticuerpos que inhiban el crecimiento de células cancerosas que expresen en exceso HER2. En una realización, el anticuerpo inhibidor del crecimiento de elección es capaz de inhibir el crecimiento de células SK-BR-3 en cultivo celular en aproximadamente 20 – 100 % y preferiblemente en aproximadamente 50 – 100 % con una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 μ g/ml. Para identificar dichos anticuerpos, se puede realizar el ensayo con SK-BR-3 descrito en la patente de EE.UU. nº 5.677.171. De acuerdo con este ensayo, las células SK-BR-3 se cultivan en una mezcla 1: 1 de F12 y medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina y penicilina-estreptomycin. Se cultivan con 20.000 células SK-BR-3 en una placa de cultivo celular de 35 mm (placa de 2 ml/35 mm). Se añaden de 0,5 a 30 μ g/ml del anticuerpo contra HER2 por placa. Después de 6 días, se cuenta el número de células comparado con las células no tratadas usando un contador celular electrónico COULTER™. Los anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SK-BR-3 en aproximadamente 20 – 100 % o aproximadamente 50 – 100 % se pueden seleccionar como anticuerpos inhibidores del crecimiento. Véase, la patente de EE.UU. nº 5.677.171 para ensayos para la selección de anticuerpos inhibidores del crecimiento, tales

como 4D5 y 3E8.

[0232] Con el fin de seleccionar anticuerpos contra HER2 que induzcan la apoptosis, está disponible un ensayo de unión de anexina usando células BT474. Las células BT474 se cultivan y se siembran en placas como se ha discutido en el párrafo precedente. Después se separa el medio y se sustituye por medio de nueva aportación solo o medio que contienen 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal. Después de un periodo de incubación de 3 días, se lavan las monocapas con PBS y se desprenden por tripsinización. Después las células se centrifugan, se vuelven a suspender en tampón de unión de Ca^{2+} y se reparten en partes alícuotas en tubos como se ha discutido antes para el ensayo de muerte celular. Después, los tubos reciben la anexina marcada (p. ej., anexina V-FTIC) (1 µg/ml). Las muestras se pueden analizar usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y el software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos que indujeron niveles estadísticamente significativos de unión de anexina con respecto al control, se seleccionan como anticuerpos inductores de apoptosis. Además del ensayo de unión de anexina, está disponible un ensayo de tinción de ADN usando células BT474. Con el fin de llevar a cabo este ensayo, se incuban células BT474, que se han tratado con el anticuerpo de interés como se ha descrito en los dos párrafos precedentes, con HOECHST 33342™ 9 µg/ml durante 2 h a 37 °C, después se analizan en un citómetro de flujo EPICS ELITE™ (Coulter Corporation) usando el software MODFIT LT™ (Verity Software House). Los anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas que es 2 veces mayor o más (preferiblemente 3 veces mayor o más) que el de las células no tratadas (hasta 100 % de células apoptóticas) se pueden seleccionar como anticuerpos proapoptóticos usando este ensayo. Véase el documento WO98/17797 para ensayos de selección de anticuerpos contra HER2 que inducen apoptosis, tales como 7C2 y 7F3.

[0233] Para seleccionar anticuerpos que se unen a un epítipo en el HER2 unido por un anticuerpo de interés, se puede llevar a cabo un ensayo rutinario de bloqueo cruzado como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), para evaluar si el anticuerpo bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo, tal como 2C4 o Pertuzumab, al HER2. Alternativa o adicionalmente, se puede llevar a cabo el cartografiado de epítopos por procedimientos conocidos en la materia y/o se puede estudiar la estructura del anticuerpo contra HER2 (Franklin y col. *Cancer Cell* 5: 317 – 328 (2004)).

(ix) *Inmunoconjugados*

[0234] En el presente documento se describen inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (p. ej., una toxina molécula pequeña o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

[0235] Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se han descrito antes. Los conjugados de un anticuerpo y una o más moléculas pequeñas toxinas, tales como una caliqueamicina, una maitansina (patente de EE.UU. nº 5.208.020), un tricoteno, y CC1065, también están contemplados en el presente documento.

[0236] El anticuerpo puede estar conjugado con una o más moléculas de maitansina (p. ej., de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina se puede convertir, por ejemplo, en May-SS-Me que se puede reducir a May-SH3 y hacer reaccionar con el anticuerpo modificado (Chari y col. *Cancer Research* 52: 127 – 131 (1992)) para generar un inmunoconjugado de maitansinoide-anticuerpo.

[0237] Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo contra HER2 conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina es capaz de producir roturas en el ADN bicatenario en concentraciones inferiores a picomolar. Los análogos estructurales de la caliqueamicina que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman y col. *Cancer Research* 53: 3336 – 3342 (1993) y Lode y col. *Cancer Research* 58: 2925 – 2928 (1998)). Véanse también las patentes de EE.UU. nº 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586; y 5.773.001.

[0238] Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen la cadena A de la toxina diftérica, fragmentos activos que no se unen a la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de dianthin, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre, 1993.

[0239] En el presente documento se describe un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (p. ej., una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

[0240] Están disponibles una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos contra HER2 radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu.

[0241] Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden hacer usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3- (2-piridilditiol) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4- (N-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo.HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis- (p-diazoniobenzoi)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolideno), y compuestos bis-fluoro activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta y col. *Science* 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil frente a ácidos, conector sensible a peptidasas, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari y col. *Cancer Research* 52: 127 – 131 (1992)).

[0242] Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo contra HER2 y el agente citotóxico se puede hacer, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos.

[0243] El anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como la estreptavidina) para usarlo para dirigirlo al tumor, en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, y después se elimina el conjugado no unido de la circulación usando un agente de depuración y después se administra un "ligando" (p. ej., avidina) que se conjuga con el agente citotóxico (p. ej., radionucleótido).

(x) Otras modificaciones de anticuerpos

[0244] En el presente documento se contemplan otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede unir a una variedad de polímeros no proteínicos, p. ej., polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede estar atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina o microcápsulas de poli (metacrilato de metilo), respectivamente), en sistema de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

[0245] Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, para así potenciar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, se puede introducir un resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de esta forma la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodímero así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor citotoxicidad mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véase Caron y col., *J. Exp Med.* 176: 1191 – 1195 (1992) y Shopes, B. *J. Immunol.* 148: 2918 – 2922 (1992). Los anticuerpos homodímeros con una actividad antitumoral potenciada también se pueden preparar usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff y col. *Cancer Research* 53: 2560 – 2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles y puede tener de esta forma capacidades potenciadas de lisis del complemento y ADCC. Véase Stevenson y col. *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219 – 230 (1989).

[0246] El documento WO00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función de ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, en los que los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácidos en la región Fc de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc. Preferiblemente la región Fc alterada es una región Fc de IgG1 humana que comprende o consiste en sustituciones en 1, 2 o 3 de estas posiciones.

[0247] Los anticuerpos con unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas, se describen en el documento WO99/51642, patente de EE.UU. n° 6.194.551B1, patente de EE.UU. n° 6.242.195B1, patente de EE.UU. n° 6.528.624B1 y patente de EE.UU. n° 6.538.124 (Idusogie y col.). Los anticuerpos comprenden una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de su región Fc.

[0248] Para aumentar la semivida del anticuerpo en el suero, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor

de rescate en el anticuerpo (en especial un fragmento de anticuerpo) como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.739.277. Como se usa en el presente documento la expresión “epítipo de unión al receptor de rescate” se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable del aumento de la semivida en el suero in vivo de la molécula de IgG. Los anticuerpos con sustituciones en su región Fc y mayor semivida en el suero, también se describen en el documento WO00/42072 (Presta, L.).

[0249] Los anticuerpos diseñados con tres o más (preferiblemente cuatro) sitios de unión del antígeno funcional también están contemplados (solicitud US nº US2002/0004587 A1, Miller y col.).

[0250] Los anticuerpos contra HER2 descrito en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por procedimientos conocidos en la materia, como se describe en Epstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); patentes de EE.UU. nº 4.485.045 y 4.544.545; y documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre, 1997. Los liposomas con un tiempo en la circulación potenciado se describen en la patente de EE.UU. nº 5.013.556.

[0251] Se pueden generar liposomas particularmente útiles por el procedimiento evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poros definido para dar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a los liposomas como se describe en Martin y col. *J. Biol. Chem.* 257: 286 – 288 (1982) por reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente el liposoma contiene un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon y col. *J. National Cancer Inst.* 81 (19)1484 (1989).

(ix) *Anticuerpos de ejemplo*

[0252] Los anticuerpos de ejemplo que se pueden formular de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitar, los siguientes:

anticuerpos dirigidos contra ErbB, incluyendo anticuerpos dirigidos contra HER2, tales como los descritos con más detalle en el presente documento;

anticuerpos que se unen a un marcador de superficie de linfocitos T, tales como CD19, CD20 (por ejemplo Rituximab (RITUXAN®) y 2H7 humanizado), CD22, CD40 o BR3;

anticuerpos que se unen a IgE, incluyendo Omalizumab (XOLAIR®) disponible en el comercio en Genentech, E26 (Figs. 17A – B en el presente documento), HAE1 (Figs. 17A – B en el presente documento), anticuerpo IgE con una sustitución de aminoácido en la posición 265 de una región Fc del mismo (documento US 2004/0191244 A1), Hu-901 (Figs. 17A – B en el presente documento), un anticuerpo IgE como en el documento WO2004/070011, o un anticuerpo (incluyendo fragmentos de anticuerpo y anticuerpos de longitud completa) que comprenden los dominios variables de cualquiera de los anticuerpos IgE. Véase, también, Presta y col., *J. Immunol.* 151: 2623 – 2632 (1993); publicación internacional nº WO 95/19181; patente de EE.UU. nº 5.714.338, concedida el 3 de febrero, 1998; patente de EE.UU. nº 5.091.313, concedida el 25 de febrero, 1992; documento WO 93/04173 publicado el 4 de marzo, 1993; documento WO 99/01556 publicado el 14 de enero, 1999; y patente de EE.UU. nº 5.714.338;

anticuerpos que se unen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o un receptor del mismo, incluyendo Bevacizumab (AVASTIN™), disponible en el comercio en Genentech, y Ranibizumab (LUCHEIMS™);

anticuerpos dirigidos contra IL-8 (St John y col., *Chest*, 103: 932 (1993), y publicación internacional nº WO 95/23865);

anticuerpos dirigidos contra PSCA (documento WO01/40309);

anticuerpos dirigidos contra CD40, incluyendo S2C6 y variantes humanizadas del mismo (documento WO00175348);

anticuerpos dirigidos contra CD11a, incluyendo efalizumab (RAPTIVA®) (patente de EE.UU. nº 5.622.700, documento WO 98/23761, Steppe y col., *Transplant Intl.* 4: 3 – 7 (1991), y Hourmant y col., *Transplantation* 58: 377 – 380 (1994));

anticuerpos dirigidos contra CD18 (patente de EE.UU. nº 5.622.700, concedida el 22 de abril, 1997, o como en el documento WO 97/26912, publicado el 31 de julio, 1997);

anticuerpos dirigidos contra el receptor Apo-2 (documento WO 98/51793 publicado el 19 de noviembre, 1998);

- anticuerpos dirigidos contra TNF-alfa incluyendo cA2 (REMICADE®), CDP571 y MAK-195 (Véase, patente de EE.UU. nº 5.672.347 concedido el 30 de septiembre, 1997, Lorenz y col. *J. Immunol.* 156 (4): 1646 – 1653 (1996), y Dhainaut y col. *Crit. Care Med.* 23 (9): 1461 – 1469 (1995));
- 5 anticuerpos dirigidos contra el factor tisular (TF) (patente europea nº 0420937 B1 concedida el 9 de noviembre, 1994);
- anticuerpos dirigidos contra integrina $\alpha 4\beta 7$ humana (documento WO 98/06248 publicado el 19 de febrero, 1998);
- 10 anticuerpos dirigidos contra EGFR, incluyendo anticuerpo 225 quimerizado o humanizado como en el documento WO 96/40210 publicado el 19 de diciembre, 1996;
- anticuerpos dirigidos contra CD3, tales como OKT3 (patente de EE.UU. nº 4.515.893 concedido el 7 de mayo, 1985);
- 15 anticuerpos dirigidos contra CD25 o contra tac, tales como CHI-621 (SIMULECT®) y (ZENAPAX®) (véase la patente de EE.UU. nº 5.693.762 concedida el 2 de diciembre, 1997);
- anticuerpos dirigidos contra CD4, tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy y col. *Arthritis Rheum.* 39 (1): 52 – 56 (1996));
- 20 anticuerpos dirigidos contra CD52, tales como CAMPATH-1H (Riechmann y col. *Nature* 332: 323 – 337 (1988);
- anticuerpos dirigidos contra el receptor de Fc, tales como el anticuerpo M22 dirigido contra $Fc\gamma RI$ como en Graziano y col., *J. Immunol.* 155 (10): 4996 – 5002 (1995);
- 25 anticuerpos dirigidos contra el antígeno carcinoembrionario (CEA) tales como hMN-14 (Sharkey y col. *Cancer Res.* 55 (23Suppl): 5935s – 5945s (1995);
- anticuerpos dirigidos contra células epiteliales de mama incluyendo huBrE-3, hu-Mc 3 and CHL6 (Ceriani y col. *Cancer Res.* 55 (23): 5852s – 5856s (1995); y Richman y col. *Cancer Res.* 55 (23 Suppl): 5916s – 5920s (1995));
- anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon tales como C242 (Litton y col. *Eur J. Immunol.* 26 (1): 1 – 9 (1996));
- 35 anticuerpos dirigidos contra CD38, p. ej. AT 13/5 (Ellis y col. *J. Immunol.* 155 (2): 925 – 937 (1995));
- anticuerpos dirigidos contra CD33, tales como Hu M195 (Jurcic y col. *Cancer Res.* 55 (23 Suppl): 5908s – 5910s (1995) y CMA-676 o CDP771;
- 40 anticuerpos dirigidos contra CD22, tales como LL2 o LymphoCide (Juweid y col. *Cancer Res.* 55 (23 Suppl): 5899s – 5907s (1995);
- anticuerpos dirigidos contra EpCAM, tales como 17 – 1A (PANOREX®);
- 45 anticuerpos dirigidos contra GpIIb/IIIa, tales como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO®);
- anticuerpos dirigidos contra RSV, tales como MEDI-493 (SYNAGIS®);
- 50 anticuerpos dirigidos contra CMV, tales como PROTOVIR®;
- anticuerpos dirigidos contra el VIH tales como PRO542;
- anticuerpos dirigidos contra el virus de la hepatitis, tales como el anticuerpo dirigido contra Hep B OSTAVIR®;
- 55 anticuerpo dirigido contra CA 125 OvaRex;
- anticuerpo dirigido contra el epítipo GD3 idiótipo BEC2;
- 60 anticuerpo dirigido contra $\alpha v\beta 3$ VITAMIN®;
- anticuerpo dirigido contra el carcinoma de células renales humanas, tales como ch-G250; ING-1;
- anticuerpo dirigido contra 17 – 1A humano (3622W94);

anticuerpo dirigido contra el tumor colorrectal humano (A33);

anticuerpo dirigido contra el melanoma humano R24 dirigido contra el gangliósido GD3;

anticuerpo dirigido contra el carcinoma de células escamosas (SF-25); y

anticuerpos dirigidos contra el antígeno de leucocitos humano (HLA), tales como Smart ID10 y el anticuerpo dirigido contra HLA DR Oncolym (Lym-1).

(xi) *Composiciones de variantes de anticuerpos*

[0253] En el presente documento se describen formulaciones que comprenden una composición que comprende una mezcla de un anticuerpo de la especie principal y una o más variantes del mismo. Cuando el anticuerpo de la especie principal se une a HER2, preferiblemente el anticuerpo contra HER2 (uno o los dos del anticuerpo contra HER2 de la especie principal y variante del anticuerpo) es uno que se une al Dominio II de HER2, inhibe la dimerización de HER de forma más eficaz que Trastuzumab, y/o se une a un sitio de unión heterodímero de HER2. El anticuerpo de la especie principal puede ser uno que comprende las secuencias de aminoácidos ligera variable y pesada variable de las SEQ ID Nos. 3 y 4, y los más preferiblemente que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID Nos. 15 y 23, y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID Nos. 16 y 24.

[0254] La composición de anticuerpos contra HER2 formulada puede comprender una mezcla del anticuerpo contra HER2 de la especie principal y una variante de la secuencia de aminoácidos del mismo que comprende una extensión líder amino terminal. Preferiblemente, la extensión líder amino terminal está en una cadena ligera de la variante del anticuerpo (por ejemplo, en una o dos cadenas ligeras de la variante del anticuerpo). El anticuerpo contra HER2 de la especie principal o la variante del anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmentos Fab o F(ab')₂), pero preferiblemente ambos son anticuerpos de longitud completa. La variante del anticuerpo del presente documento puede comprender una extensión líder amino terminal en una cualquiera o más de las cadenas pesadas o ligeras del mismo. Preferiblemente, la extensión líder amino terminal está en una o dos cadenas ligeras del anticuerpo. La extensión líder amino terminal preferiblemente comprende o consiste en VHS-. La presencia de la extensión líder amino terminal en la composición se puede detectar por diferentes técnicas analíticas incluyendo, pero sin limitar, análisis de la secuencia N-terminal, ensayo de heterogeneidad de la carga (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis capilar de zona), espectrometría de masas, etc. La cantidad de la variante del anticuerpo en la composición, en general varía desde una cantidad que constituye el límite de detección de cualquier ensayo (preferiblemente análisis de la secuencia N-terminal) usado para detectar la variante hasta una cantidad menor que la cantidad del anticuerpo de la especie principal. En general, aproximadamente 20 % o menos (p. ej. de aproximadamente 1 % a aproximadamente 15 %, por ejemplo de 5 % a aproximadamente 15 %) de moléculas de anticuerpo en la composición comprenden una extensión líder amino terminal. Dichas cantidades en porcentaje se determinan preferiblemente usando el análisis de secuencia N-terminal cuantitativo o el análisis de intercambio catiónico (preferiblemente usando una columna de intercambio catiónico débil, de alta resolución, tal como una columna de intercambio catiónico PROPAC WCX-10™). Aparte que la variante de la extensión líder amino terminal, están contempladas otras alteraciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la especie principal y/o la variante, incluyendo, pero sin limitar, un anticuerpo que comprende un resto de lisina C-terminal en una o ambas cadenas pesadas del mismo, una variante del anticuerpo desamidada, etc.

[0255] Además, el anticuerpo de la especie principal o la variante pueden comprender variaciones de glicosilación, cuyos ejemplos no limitantes incluyen el anticuerpo contra HER2 que comprende una estructura de oligosacárido G1 o G2 unida a la región Fc del mismo, anticuerpo contra HER2 que comprende un resto de hidrato de carbono unido a una cadena ligera del mismo (por ejemplo, uno o dos restos de hidrato de carbono unidos a una o dos cadenas ligeras del anticuerpo), anticuerpo contra HER2 que comprende una cadena pesada no glicosilada.

III. Preparación de la formulación

[0256] La presente invención proporciona, en un primer aspecto, una formulación farmacéutica estable como se define en la reivindicación 1. Sin embargo, el anticuerpo en la formulación puede ser un fragmento de anticuerpo que comprende una región de unión al antígeno tal como un fragmento Fab o F(ab')₂.

[0257] En el presente documento se describe una formulación farmacéutica que comprende, o consiste esencialmente, en un anticuerpo IgG1 de longitud completa susceptible de desamidación o agregación, en una cantidad de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml; tampón de histidina-acetato, pH 5,5 a 6,5; sacárido seleccionado del grupo que consiste en trealosa y sacarosa, en una cantidad de aproximadamente 60 mM a aproximadamente 250 mM; y polisorbato 20 en una cantidad de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,1

5 %.

5 **[0258]** En el presente documento se describe una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une al dominio II de HER2 en un tampón de histidina a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, un sacárido y un tensioactivo. Por ejemplo, la formulación puede comprender Pertuzumab en una cantidad de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml, tampón de histidina-acetato, sacarosa y polisorbato 20, en la que el pH de la formulación es de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5.

10 **[0259]** La formulación es especialmente útil para anticuerpos que son susceptibles a la desamidación y/o agregación y/o fragmentación, en cuanto que el tampón retarda la desamidación y/o agregación y/o fragmentación del anticuerpo formulado en la misma. Además, a diferencia de otros tampones de histidina preparados usando HCl, el tampón de histidina-acetato carece de ion cloruro, lo cual se ha encontrado que es beneficioso en el presente documento, en cuanto que este tampón cuando se combina con sacárido tiene el mismo efecto protector sobre el anticuerpo que el polisorbato 20, y es estable y compatible con el almacenamiento en depósitos de acero inoxidable.

15 Por lo tanto, además de la propia formulación que comprende el anticuerpo susceptible a la desamidación, agregación y/o fragmentación, la invención proporciona un procedimiento para reducir la desamidación, agregación y/o fragmentación de un anticuerpo monoclonal terapéutico (por ejemplo, con respecto a una composición a un pH diferente o en un tapón diferente), que comprende formular el anticuerpo en un tampón de histidina-acetato, pH de 5,5 a 6,5. En esta realización, se puede determinar o medir la desamidación, agregación y/o fragmentación antes y

20 después de formular el anticuerpo, demostrando el anticuerpo formulado una desamidación, agregación y/o fragmentación aceptables en la formulación y tras su almacenamiento.

25 **[0260]** Los ejemplos de anticuerpos CD20 que se pueden formular en el presente documento incluyen: "C2B8" que ahora se llama "Rituximab" ("RITUXAN®") disponible en el comercio en Genentech (véase también la patente de EE.UU. nº 5.736.137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con itrio-[90] denominado "Y2B8" o "Ibritumomab Tiuxetan" ZEVALIN® disponible en el comercio en Biogen-Idec (véase también la patente de EE.UU. nº 5.736.137); IgG2a murino "B1," también denominado "Tositumomab," opcionalmente marcado con ¹³¹I para generar el anticuerpo "131I-B1" (yodo I131 tositumomab, BEXXAR™) (patente de EE.UU. nº 5.595.721); anticuerpo monoclonal murino "1F5" (Press y col. *Blood* 69 (2): 584 – 591 (1987) y variantes del mismo que incluyen 1F5 de "estructura armazón parcheada" o humanizado (documento WO03/002607, Leung, S.); (depósito en ATCC HB-96450); anticuerpo 2H7 murino y 2H7 quimérico (Clark y col. *PNAS* 82: 1766 – 1770 (1985); patente de EE.UU. nº 5.500.362); 2H7 humanizado; huMax-CD20 (documento WO04/035607, Genmab, Dinamarca); AME-133 (Applied Molecular Evolution); anticuerpo A20 o variantes del mismo tales como anticuerpo A20 quimérico o humanizado (cA20, hA20, respectivamente) (US 2003/0219433, *Immunomedics*); y anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles en International Leukocyte Typing Workshop (Valentine y col., In: *Leukocyte Typing III* (Mc Michael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)).

35 **[0261]** Un anticuerpo CD20 puede ser un anticuerpo 2H7 humanizado. Por ejemplo, 2H7v16 y 2H7v511. El anticuerpo 2H7v16 humanizado puede ser un anticuerpo intacto o fragmento de anticuerpo que comprende las secuencias ligera variable y pesada variable, Figs.18A – B (SEQ ID Nos. 26 y 29). Cuando el anticuerpo 2H7v16 humanizado es un anticuerpo de longitud completa, puede comprender las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada con SEQ ID Nos. 63 y 65.

40 **[0262]** Cuando el anticuerpo se une al VEGF, comprende preferiblemente las secuencias del dominio variable como se representa en la Fig. 19. El anticuerpo dirigido contra VEGF más preferido es el anticuerpo IgG1 humanizado de longitud completa, Bevacizumab (AVASTIN™), disponible en el comercio en Genentech.

45 **[0263]** Cuando el anticuerpo formulado se une a IgE, se puede seleccionar del grupo que consiste en: E25, Omalizumab (XOLAIR®) disponible en el comercio en Genentech (véase también las Figs. 17A – B), E26 (Figs. 17A – B en el presente documento), HAE1 (Figs. 17AB en el presente documento), anticuerpo IgE con una sustitución de aminoácidos en la posición 265 de una región Fc del mismo (US 2004/0191244 A1), Hu-901 (Figs. 17A – B en el presente documento), un anticuerpo IgE como en el documento WO2004/070011, o un anticuerpo (incluyendo fragmentos de anticuerpo y anticuerpos de longitud completa) que comprende los dominios variables de cualquiera de esos anticuerpos IgE.

50 **[0264]** Cuando el anticuerpo se une a un receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) o a un receptor de muerte, se une preferiblemente a DR5, y preferiblemente es un anticuerpo agonista. Las publicaciones en este campo incluyen Sheridan y col., *Science*, 277: 818 – 821 (1997), Pan y col., *Science*, 277: 815 – 818 (1997), documentos WO98/51793 publicado el 19 de noviembre, 1998; WO98/41629 publicado el 24 de septiembre, 1998; Screatton y col., *Curr. Biol.*, 7: 693 – 696 (1997); Walczak y col., *EMBO J.*, 16: 5386 – 5387 (1997); Wu y col., *Nature Genetics*, 17: 141 – 143 (1997); documentos WO98/35986 publicado el 20 de agosto, 1998; EP870827 publicado el 14 de octubre, 1998; WO98/46643 publicado el 22 de octubre, 1998; WO99/02653 publicado el 21 de enero, 1999; WO99/09165 publicado el 25 de febrero, 1999; WO99/11791 publicado el 11 de marzo, 1999; US 2002/0072091 publicado el 13 de agosto, 2002; US 2002/0098550 publicado el 7 de diciembre, 2001; US 6.313.269 concedido el 6

de diciembre, 2001; US 2001/0010924 publicado el 2 de agosto, 2001; US 2003/01255540 publicado el 3 de julio, 2003; US 2002/0160446 publicado el 31 de octubre, 2002, US 2002/0048785 publicado el 25 de abril, 2002; US 6.342.369 concedido en febrero, 2002; US 6.569.642 concedido el 27 de mayo, 2003, US 6.072.047 concedido el 6 de junio, 2000, US 6.642.358 concedido el 4 de noviembre, 2003; US 6.743.625 concedido el 1 de junio, 2004. El anticuerpo DR5 más preferido es Apomab.

[0265] Cada una de las formulaciones indicadas antes comprende un tampón, preferiblemente un tampón de histidina, y lo más preferiblemente un tampón de histidina-acetato con un pH de 5,5 a 6,5, preferiblemente de 5,8 a 6,2, por ejemplo aproximadamente 6,0. La concentración del tampón viene dada, al menos en parte, por el pH deseado. Las concentraciones de ejemplo para el tampón están en el intervalo de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM, preferiblemente de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM, lo más preferiblemente aproximadamente 20 mM.

[0266] La concentración del anticuerpo en la formulación está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. La concentración de anticuerpo se puede determinar basándose en el uso a la que está destinada y el modo de administración de la formulación. Por ejemplo, cuando la formulación es para la administración IV (p. ej. un anticuerpo HER2), la concentración de anticuerpo en la formulación es preferiblemente de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml. En la formulación de Pertuzumab ilustrada destinada a la administración intravenosa (IV), la concentración de anticuerpo era de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml, lo más preferiblemente de aproximadamente 30 mg/ml.

[0267] Cuando el anticuerpo es para la administración s.c. o i.m. (p. ej., para un anticuerpo dirigido contra IgE) pueden ser convenientes concentraciones mayores del anticuerpo. Dichas concentraciones del anticuerpo sustancialmente altas pueden ser de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, o de aproximadamente 80 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, o de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml.

[0268] Cuando la formulación comprende un anticuerpo DR5, tal como Apomab, las concentraciones de anticuerpo de ejemplo son de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, por ejemplo aproximadamente 20 mg/ml de anticuerpo DR5; siendo útiles dichas formulaciones para la administración intravenosa.

[0269] La formulación para la administración es preferiblemente una formulación acuosa (no liofilizada) y no se ha sometido a liofilización previa. Aunque la formulación puede ser liofilizada, preferiblemente no lo es. Sin embargo, la congelación de la formulación acuosa, sin el secado simultáneo que se produce durante la liofilización, está contemplada específicamente en el presente documento, y facilita el almacenamiento a largo plazo de la misma, por ejemplo en un depósito de acero inoxidable.

[0270] Preferiblemente, la formulación comprende además un sacárido, lo más preferiblemente un disacárido, tal como trealosa o sacarosa. En general, el sacárido está incluido en una cantidad que reduce la formación de agregados solubles, tal como la que se produce tras la congelación/descongelación. Las concentraciones de sacárido de ejemplo están en el intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M, por ejemplo de aproximadamente 60 mM a aproximadamente 250 mM, y lo más preferiblemente aproximadamente 120 mM para una formulación de anticuerpo contra HER2, y aproximadamente 240 mM para una formulación de anticuerpo DR5.

[0271] Aunque en el presente documento se ha encontrado que una formulación que comprende tampón de histidina-acetato y sacárido era estable, la formulación comprende además opcionalmente tensioactivo, tal como polisorbato, lo más preferiblemente polisorbato 20. En general, el tensioactivo está incluido en una cantidad que reduce la formación de agregados insolubles (tal como los que se producen tras la agitación o transporte). La concentración de tensioactivo es preferiblemente de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 1,0 %, lo más preferiblemente de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,1 %, por ejemplo aproximadamente 0,02 %.

[0272] Opcionalmente, la formulación no contiene una cantidad tonificante de una sal tal como cloruro sódico.

[0273] En general, la formulación es estéril y esto se puede lograr de acuerdo con los procedimientos conocidos para el experto, para generar formulaciones farmacéuticas estériles adecuadas para la administración a sujetos humanos, incluyendo la filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la preparación de la formulación.

[0274] Además, la formulación es convenientemente una que se ha demostrado que es estable tras el almacenamiento. Hay diferentes ensayos de estabilidad disponibles para el experto en la materia, para confirmar la estabilidad de la formulación. Por ejemplo, la formulación puede ser una que se encuentre que es estable tras almacenamiento: a aproximadamente 40 °C durante al menos 4 semanas; a aproximadamente 5 °C o aproximadamente 15 °C durante al menos 3 meses o al menos 1 año; y/o aproximadamente -20 °C durante al menos 3 meses. La estabilidad se puede ensayar evaluando la estabilidad física, la estabilidad química y/o la

actividad biológica del anticuerpo en la formulación en el momento de la formulación, así como después de almacenamiento a las temperaturas indicadas. La estabilidad física se puede evaluar de forma cualitativa y/o cuantitativa en una variedad de formas diferentes, que incluyen la evaluación de la formación de agregados (por ejemplo usando cromatografía de exclusión por tamaños, midiendo la turbidez y/o por inspección visual); evaluando la heterogeneidad de carga usando cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis capilar de zona; por análisis de secuencia amino terminal o carboxi terminal; análisis por espectrometría de masas; análisis SDS-PAGE para comparar el anticuerpo reducido y el intacto; análisis por cartografía de péptidos (por ejemplo, tríptico o LYS-C); evaluando la actividad biológica o la función de unión al antígeno del anticuerpo; etc. La inestabilidad puede producir agregación, desamidación (p. ej., desamidación de Asn), oxidación (p. ej., oxidación de Met), isomerización (p. ej., isomerización de Asp), corte/hidrólisis/fragmentación (p. ej. fragmentación de la región bisagra), formación de succinimida, cisteína (s) desemparejada (s), extensión N-terminal, procesado C-terminal, diferencias de glicosilación, etc. La actividad biológica o la función de unión al antígeno se pueden evaluar usando diferentes técnicas disponibles para el experto en la materia.

[0275] Como se ha indicado antes, la congelación de la formulación está específicamente contemplada en el presente documento. Por lo tanto, se puede ensayar la estabilidad en la formulación tras congelación y descongelación.

[0276] En el presente documento se describe un procedimiento para hacer una formulación farmacéutica que comprende preparar la formulación como se describe en el presente documento, y evaluar la estabilidad física, la estabilidad química o la actividad biológica del anticuerpo monoclonal en la formulación.

[0277] La formulación se puede proporcionar dentro de un vial con un tapón perforable mediante una jeringa, preferiblemente en forma acuosa. De forma conveniente el vial se almacena a aproximadamente 2 – 8 °C hasta que se administra a un sujeto que lo necesite. El vial puede ser por ejemplo un vial de 20 cc (por ejemplo para una dosis de 420 mg) o un vial de 50 cc (por ejemplo para una dosis de 1050 mg). Para un anticuerpo DR5, tal como Apomab, la formulación se puede proporcionar en un vial de vidrio de 5 cc (p. ej., 5,5 ml de carga).

[0278] La formulación se puede proporcionar dentro de un depósito de acero inoxidable. La formulación en el depósito de acero inoxidable está opcionalmente congelada y no liofilizada.

[0279] Se pueden incluir en la formulación uno o más vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables tales como los descritos en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980), con la condición de que no afecten de forma adversa a las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores y en las dosificaciones y concentraciones usadas e incluyen agentes de tamponamiento adicionales; codisolventes; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos con metales (p. ej. complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; conservantes; y/o contraiones formadores de sal tales como sodio.

IV. Tratamiento con la formulación de anticuerpo

[0280] La invención permite un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto que comprende administrar la formulación descrita en el presente documento a un sujeto, en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o el trastorno.

[0281] Cuando el anticuerpo en la formulación se une a HER2, preferiblemente se usa para tratar el cáncer. En general, el cáncer comprenderá células que expresan HER2, de modo que el anticuerpo contra HER2 del presente documento se puede unir a las células cancerosas. Por lo tanto, esto se refiere a un procedimiento para tratar el cáncer que expresa HER2 en un sujeto, que comprende administrar la formulación farmacéutica del anticuerpo contra HER2 al sujeto en una cantidad eficaz para tratar el cáncer. Los diferentes de cánceres que se pueden tratar con la composición se han citado en la sección de definiciones anterior.

[0282] También está contemplado que la formulación del anticuerpo contra HER2 se pueda usar para tratar diferentes enfermedades o trastornos que no son tumores malignos, e incluyen una enfermedad autoinmunitaria (p. ej. psoriasis); endometriosis, esclerodermia, reestenosis; pólipos tales como pólipos en el colon, pólipos nasales o pólipos gastrointestinales; fibroadenoma, enfermedad respiratoria (véase la definición anterior); colecistitis, neurofibromatosis; enfermedad poliquística del riñón; enfermedades inflamatorias; trastornos de la piel como la psoriasis y la dermatitis; enfermedad vascular (véase la definición anterior); afecciones que implican la proliferación anormal de las células vasculares epiteliales; úlceras gastrointestinales; enfermedad de Menetrier; adenomas secretores o síndrome de pérdida de proteínas; trastornos renales; trastornos angiogénicos; enfermedades oculares tales como degeneración macular relacionada con la edad; síndrome de presunta histoplasmosis ocular; neovascularización retiniana por retinopatía diabética proliferativa, vascularización de la retina, retinopatía diabética o degeneración macular relacionada con la edad; patologías asociadas a huesos tales como la osteoartritis, raquitismo y osteoporosis; daño después de un suceso isquémico cerebral; enfermedades fibróticas o edema tales

como cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, tiroiditis, síndrome de hiperviscosidad sistémico, enfermedad de Osler Weber-Rendu, enfermedad pulmonar oclusiva crónica, o edema después de quemaduras, traumatismo, radiación, accidente cerebrovascular, hipoxia o isquemia; reacción de hipersensibilidad de la piel; retinopatía diabética y nefropatía diabética; síndrome de Guillain-Barre; enfermedad de injerto contra huésped o rechazo de trasplante; enfermedad de Paget; inflamación de huesos o articulaciones; fotoenvejecimiento (p. ej. causado por la radiación UV en la piel humana); hipertrofia prostática benigna; algunas infecciones microbianas incluyendo patógenos microbianos seleccionados de adenovirus, hantavirus, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia* spp. y *Bordetella pertussis*; trombos causada por la agregación plaquetaria; afecciones de la reproducción tales como endometriosis, síndrome de hiperestimulación ovárica, preeclampsia, hemorragia uterina disfuncional, o menometrorragia; sinovitis; ateroma; nefropatías agudas y crónicas (incluyendo glomerulonefritis proliferativa y diabetes inducida por enfermedad renal); eczema; formación de cicatrices hipertróficas; choque endotóxico e infección fúngica; poliposis adenomatosa familiar; enfermedades neurodegenerativas (p. ej. enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y degeneración cerebelosa); síndromes mielodisplásicos; anemia aplásica; lesión isquémica; fibrosis del pulmón; hígado o riñón; enfermedad de hipersensibilidad mediadas por linfocitos T; estenosis pilórica hipertrófica infantil; síndrome de obstrucción urinaria; artritis psoriásica; y tiroiditis de Hashimoto. Las indicaciones que no son tumores malignos preferidas para la terapia en el presente documento incluyen psoriasis, endometriosis, esclerodermia, enfermedad vascular (p. ej. reestenosis, arteriosclerosis, enfermedad arterial coronaria o hipertensión), pólipos en el colon, fibroadenoma o enfermedades respiratorias (p. ej. asma, bronquitis crónica, bronquiectasia o fibrosis quística).

[0283] Cuando el anticuerpo en la formulación se une a un marcador de superficie de linfocito B tal como CD20 o BR3, la formulación se puede usar para tratar un tumor maligno de linfocitos B, tal como NHL o LLC, una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de injerto, o para bloquear una respuesta inmunitaria frente a un antígeno extraño, tal como un anticuerpo, una toxina, un vector vírico de terapia génica, un injerto, un agente infeccioso o un aloantígeno (véase el documento WO 01/03734, Grillo-Lopez y col.).

[0284] Cuando el anticuerpo en la formulación es un anticuerpo IgE, se puede usar para tratar un trastorno mediado por IgE (USSN 2004/0197324 A1, Liu y Shire), tal como asma alérgico, rinitis alérgica, dermatitis atópica, gastroenteropatía alérgica, hipersensibilidad, eczema, urticaria, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedades parasitarias, síndrome de hiper-IgE, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, linfoplasia tímica, mieloma IgE, y reacción de huésped contra injerto.

[0285] Los anticuerpos que se unen a un receptor de la superfamilia del TNF (por ejemplo, que se unen a DR5), o que se unen al VEGF (o un receptor del mismo), se pueden usar para tratar el cáncer, varias formas del cual se describen en la sección anterior de definiciones. Preferiblemente, el cáncer tratado con una formulación de anticuerpo DR5 es un tumor sólido o NHL.

[0286] Cuando la indicación es el cáncer, el paciente se puede tratar con una combinación de la formulación de anticuerpo y un agente quimioterapéutico. La administración combinada incluye la coadministración o administración simultánea, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferiblemente hay un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Por lo tanto, el agente quimioterapéutico se puede administrar antes o después de la administración de la composición. El tiempo entre al menos una administración del agente quimioterapéutico y al menos una administración de la composición es preferiblemente aproximadamente 1 mes o menos, y lo más preferiblemente aproximadamente 2 semanas o menos. Alternativamente, el agente quimioterapéutico y la composición se administran simultáneamente al paciente, en una sola formulación o en formulaciones separadas.

[0287] El tratamiento con la formulación dará como resultado una mejora de los signos o síntomas del cáncer o enfermedad. Por ejemplo, cuando la enfermedad que se trata es el cáncer, dicha terapia puede producir una mejora en la supervivencia (supervivencia general y/o supervivencia sin avance) y/o puede producir una respuesta clínica objetiva (parcial o completa). Además, el tratamiento con la combinación del agente quimioterapéutico y la formulación de anticuerpo puede producir un beneficio terapéutico sinérgico, o mayor que el aditivo, al paciente.

[0288] Preferiblemente, el anticuerpo en la formulación administrada es un anticuerpo desnudo. Sin embargo, el anticuerpo administrado puede estar conjugado con un agente citotóxico. Preferiblemente, el inmunoconjugado y/o antígeno al que se une son internalizados por la célula, dando como resultado una mayor eficacia terapéutica del inmunoconjugado para matar la célula cancerosa a la que se une. En una realización preferida, el agente citotóxico se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

[0289] La formulación se administra a un paciente humano de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa, p. ej., en forma de bolo, o por infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica,

o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa, intramuscular o subcutánea de la composición del anticuerpo, siendo la más preferida la administración intravenosa.

5 [0290] Para el suministro subcutáneo, la formulación se puede administrar con jeringa; un dispositivo de inyección (p. ej. los dispositivos INJECTEASE™ y GENJECT™); bolígrafo inyector (tal como GENPEN™); dispositivos sin agujas (p. ej. MEDIJECTOR™ y BIOJECTOR™); o sistema de suministro de parche subcutáneo.

10 [0291] Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación adecuada del anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, como se ha definido antes, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con propósitos de prevención o terapéuticos, terapia previa, historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico que atiende. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosificación candidata inicial de anticuerpo contra HER2 o DR5 para administrar a un paciente es aproximadamente de 1 µg/kg a 50 mg/kg (p. ej. 0,1 – 20 mg/kg), sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o por infusión continua. La dosificación del anticuerpo en general estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Si se administra un agente quimioterapéutico, normalmente se administra con dosificaciones conocidas para el mismo, u opcionalmente más bajas debido a la acción combinada de los fármacos o los efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente terapéutico. La preparación y planificación de la dosificación para dichos agentes terapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o las puede determinar empíricamente el experto profesional. La preparación y planificación de la dosificación para dicha quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service* Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

25 [0292] Se pueden combinar otros regímenes terapéuticos con el anticuerpo incluyendo, pero sin limitar: un segundo (tercer, cuarto, etc.) agente quimioterapéutico (es decir, “cócteles” de diferentes agentes quimioterapéuticos); otro anticuerpo monoclonal; un agente inhibidor del crecimiento; un agente citotóxico; un agente quimioterapéutico; un fármaco dirigido al EGFR; inhibidor de tirosina quinasa; agente antiangiogénico; y/o citoquina; etc.

30 [0293] Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente se puede someter a eliminación quirúrgica de las células cancerosas y/o a terapia de radiación.

V. Artículos de fabricación

35 [0294] En el presente documento se describe un artículo de fabricación que contiene la formulación farmacéutica de la presente invención y proporciona instrucciones para su uso. El artículo de fabricación comprende un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales (p. ej., viales de cámara doble), jeringas (tales como jeringas de cámara doble) y tubos de ensayo. El recipiente puede estar formado de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene la formulación y la etiqueta sobre o asociada con el recipiente puede indicar instrucciones de uso. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial de múltiples usos, que permite administraciones repetidas (p. ej., 2 – 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos en el envase con instrucciones para usarlos como se ha indicado en la sección previa.

45 [0295] La invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben considerarse como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Formulaciones líquidas estables de Pertuzumab

55 [0296] Estos ejemplos describen el desarrollo y el ensayo de estabilidad de las formulaciones líquidas que contienen Pertuzumab con concentraciones de proteína en el intervalo de aproximadamente 10 mg/ml -180 mg/ml. Las formulaciones seleccionadas tenían turbidez baja y eran física y químicamente estables. El ion cloruro se separó de la formulación para reducir el riesgo de corrosión. La formulación era isotónica y adecuada para el suministro subcutáneo o intramuscular. La formación de agregados insolubles tras el estrés de la agitación se previno usando una formulación de histidina-acetato y sacarosa, sin necesidad de incluir polisorbato 20.

Procedimientos analíticos

Color, aspecto y transparencia (CAT)

60 [0297] El color, aspecto y transparencia de las muestras se determinó por inspección visual de viales contra un

fondo blanco y negro con luz fluorescente blanca a temperatura ambiente.

Mediciones de la concentración por UV

- 5 **[0298]** Una parte alícuota del producto líquido se diluyó primero con el tampón de la formulación de modo que la $A_{m\acute{a}x}$ cerca de 278 nm estuviera dentro de 0,5 – 1,0 unidades de absorbancia. La absorbancia UV de las muestras diluidas se midió en una cubeta de cuarzo con una longitud del camino óptico de 1 cm en un espectrofotómetro HP 8453. La absorbancia se midió a 278 nm y 320 nm. La absorbancia medida a 320 nm se usó para corregir la dispersión de luz de fondo debida a los agregados más grandes, burbujas y partículas. Las mediciones se hicieron
10 tomando como referencia el tampón de la formulación. La concentración de proteína se determinó usando un factor de absorción de $1,50 \text{ (mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Mediciones de pH

- 15 **[0299]** El pH se midió a temperatura ambiente usando un medidor de pH RADIOMETER COPENHAGEN PHM82™. La sonda usada era un electrodo combinado de vidrio/referencia con un conector radiométrico (Sigma, Cat. nº E-5759). Se usaron disoluciones estándar de pH 4,01 y pH 7,00 (EM Science) para calibrar el medidor de pH.

Cromatografía de intercambio iónico (IEX)

- 20 **[0300]** La cromatografía de intercambio catiónico se usó para medir los cambios en las variantes de carga. Este ensayo usa una columna DIONEX PROPAC WCX-10™ en un sistema de HPLC HP 1100™. Las muestras se diluyeron hasta 1 mg/ml con la fase móvil A que contenía MES 20 mM a pH 6,0, después se cargaron 50 ml de muestras diluidas en la columna que se mantuvo a temperatura ambiente. Los picos se eluyeron con un gradiente de NaCl poco profundo usando la fase móvil B que contenía MES 20 mM, NaCl 250 mM, pH 6,0. El eluyente se siguió a 280 nm. Los datos se analizaron usando el software HP CHEMSTATION™ (Rev A08.03).
25

Electroforesis capilar de zona (CZE)

- 30 **[0301]** La pureza de los fragmentos Fab y F (ab')₂ se determinó por CZE. Este ensayo se llevó a cabo en un sistema de electroforesis capilar BIORAD BIOFOCUS™ 3000™ con un capilar BIOCAP XL™, 50 µm de D.I., 44,6 cm de longitud total y 40 cm hasta el detector.

Cromatografía de exclusión por tamaño molecular (SEC)

- 35 **[0302]** La cromatografía de exclusión por tamaño molecular se usó para cuantificar agregados y fragmentos. Este ensayo usa una columna TSK G3000 SWXL™, 7,8 x 300 mm y se desarrolla en un sistema de HPLC HP 1100™. Las muestras se diluyeron hasta 10 mg/ml con la fase móvil y el volumen de inyección era 20 µl. La fase móvil era K₂HPO₄ 100 mM a pH 6,8 y la proteína se eluyó con un gradiente isocrático de 0,5 ml/min durante 45 min. La absorbancia del eluyente se siguió a 280 nm. La integración se hizo usando el software HP CHEMSTATION™ (Rev A08.03).
40

Actividad biológica

- 45 **[0303]** La actividad biológica de Pertuzumab se determinó midiendo su capacidad para inhibir la proliferación de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-175-VII.

EJEMPLO 1

- 50 **[0304]** Los fragmentos de anticuerpo Fab y F (ab')₂ de Pertuzumab se formularon con una concentración de proteína de 1,0 mg/ml en las siguientes condiciones de tampón:

citrato 10 mM, NaCl 140 mM, pH 4,0;
succinato 10 mM, NaCl 140 mM, pH 5,0;
55 succinato 10 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0;
histidina 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,0; y
glicilglicina 10 mM, NaCl 140 mM, pH 8,0.

- 60 **[0305]** Se filtró cada formulación y después se distribuyó en partes alícuotas en viales de vidrio de tipo I USP WHEATON™ de 3 cc sellados con tapones de goma butilo gris recubiertos con TEFLON™. Las muestras se almacenaron a 40 ± 2 °C. Los análisis de estabilidad del medicamento mostraron que Fab y F (ab')₂ eran más estables entre pH 5,0 y 6,0.

Tabla 2. Efecto del pH en la degradación de Fab y F (ab')₂ almacenados a 40 °C

pH de la formulación	Fab		F (ab') ₂	
	CZE % Pico principal	SEC % Pico principal	CZE % Pico principal	SEC % Pico principal
4,0	74,1	96,7	43,6	89,4
5,0	83,2	96,4	65,4	94,0
6,0	82,9	96,2	69,0	92,3
7,0	83,9	96,4	62,3	91,3
8,0	72,7	96,4	49,2	89,8

5 EJEMPLO 2

[0306] Pertuzumab se formuló en tampón de histidina-acetato 20 mM con sacarosa 120 mM y polisorbato 20 al 0,02 %. Los pH de las formulaciones se ajustaron con ácido acético hasta un pH final entre 5,0 y 7,0. La concentración de proteína era 30 mg/ml. Cada formulación se cargó en viales de vidrio de tipo I USP de 3 cc y se almacenaron a 40 °C para el análisis de estabilidad. Los resultados mostraron que Pertuzumab era más estable alrededor de pH 6,0.

Tabla 3. Efecto del pH en la degradación de Pertuzumab almacenado a 40 °C

pH de la formulación	Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (semanas)	SEC % Monómero	IEX % Pico principal
5,0	40	2	99,4	57,4
5,5	40	2	99,4	59,2
6,0	40	2	99,4	60,6
6,5	40	2	99,3	60,5
7,0	40	2	99,1	54,0
5,0	40	4	97,3	48,1
5,5	40	4	99,1	50,5
6,0	40	4	99,1	53,3
6,5	40	4	99,0	52,3
7,0	40	4	98,6	42,3

15 EJEMPLO 3

[0307] Se prepararon formulaciones de Pertuzumab con una concentración de proteína de 100 mg/ml en los siguientes excipientes:

- (1) histidina-HCl 10 mM, sacarosa 240 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 6,0;
- (2) histidina-acetato 10 mM, sacarosa 240 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 6,0;
- (3) histidina-fosfato 10 mM, sacarosa 240 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 6,0;
- (4) histidina-sulfato 10 mM, sacarosa 240 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 6,0.

[0308] Cada formulación se cargó en un vial de vidrio de tipo I FORMA VITRUM™ USP sellado con tapones de caucho butilo recubierto de FLUROTEC™. Las muestras se almacenaron a 30 °C y 40 °C y se evaluó la estabilidad de la calidad (CAT) y la pureza (SEC, IEC). Los resultados de estabilidad mostraron que Pertuzumab en el tampón de histidina-fosfato se degradaba mucho más rápido que en los otros tampones de histidina después de almacenamiento a 40 °C (Fig. 8 y Fig. 9).

EJEMPLO 4

[0309] Pertuzumab se concentró por ultrafiltración/diafiltración a diferentes concentraciones en los siguientes tampones:

- (1) histidina-acetato 20 mM, pH 6,0;
- (2) histidina-HCl 10 mM, pH 6,0; y
- (3) histidina-sulfato 10 mM, pH 6,0.

[0310] Se midió la turbidez de cada formulación antes de la filtración. Los resultados, como se muestra en la Fig. 10, demostraron que las muestras de Pertuzumab formuladas en histidina-acetato e histidina-HCl tenían menor cantidad de agregados insolubles que las de tampón de histidina-sulfato.

EJEMPLO 5

[0311] Se formuló Pertuzumab con una concentración de 30 mg/ml en histidina-acetato 20 mM, sacarosa 120 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 6,0. Pertuzumab se cargó en depósitos miniatura de acero inoxidable 316L y HASTELLOY™. Todas las muestras se almacenaron a -20 °C y 5 °C y se evaluaron la calidad (CAT), la pureza (SEC, IEC) y la concentración (UV-Vis). Los análisis de estabilidad mostraron que Pertuzumab era estable en esta formulación tras almacenamiento a -20 °C y 5 °C durante al menos 3 meses. La formulación exenta de cloruro de compatible con el depósito de acero inoxidable 316L y HASTELLOY™.

Tabla 4. Estabilidad de Pertuzumab en depósitos de acero inoxidable

Depósitos	Temp. (°C)	Tiempo (meses)	CAT	Espec. UV, (mg/ml)	SEC (% monómero)	IEC (% pico principal)
		0	Pasa ^a	29,0	99,8	67,9
316L	-20	3	Pasa	28,9	99,7	66,8
	5	3	Pasa	28,7	99,7	66,8
HASTELLOY™	-20	3	Pasa	29,1	99,7	66,8
	5	3	Pasa	28,8	99,7	67,7

^a. Pasa para el color, aspecto y transparencia: disolución de transparente a ligeramente opalescente, de incolora a amarillo pálido.

EJEMPLO 6

[0312] Se formuló Pertuzumab usando filtración de flujo tangencial (TFF). La formulación final contiene histidina-acetato 20 mM, sacarosa 120 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 6,0, con una concentración de proteína de 30 mg/ml. Las muestras se cargaron en un vial de vidrio de tipo I USP 20 M1 FORMA VITRUM™ cerrado con tapones de caucho butilo recubiertos de FLUROTEC™ de 20 mm, y sellados con tapas *flip-top* de aluminio. Todas las muestras se almacenaron a -70 °C, 5 °C, 15 °C y se evaluó la estabilidad de la calidad (CAT), pureza (SE, IEC), concentración (UV-Vis) y potencia (bioensayo). Los resultados mostraron que Pertuzumab es estable en esta formulación tras almacenamiento a 5 °C y 15 °C durante al menos 3 meses.

Tabla 5. Estabilidad de Pertuzumab en viales de vidrio

Temp. (°C)	Tiempo (meses)	CAT	Espec. UV, (mg/ml)	SEC (% monómero)	IEC (% pico principal)	Bioensayo (% actividad específica)
	0	Pasa	29,2	99,8	64,1	83
-70	1	Pasa	29,7	99,8	65,2	92
	3	Pasa	30,7	99,8	67,0	93
5	3	Pasa	30,4	99,7	67,2	90
15	1	Pasa	29,7	99,7	64,4	78
	3	Pasa	30,4	99,7	65,5	93

EJEMPLO 7

[0313] Se formuló Pertuzumab 100 mg/ml en las siguientes condiciones de tampón:

- (1) histidina-HCl 10 mM, pH 6,0;
- (2) histidina-HCl 10 mM, sacarosa 240 mM, pH 6,0;
- (3) succinato 20 mM a pH 6,0; y
- (4) succinato 20 mM, sacarosa 240 mM a pH 6,0.

[0314] A cada formulación se le añadió una concentración diferente de polisorbato 20. Todas las muestras se cargaron en viales de vidrio de tipo I USP de 3 cc y se agitaron en horizontal a 70 rpm a temperatura ambiente hasta 7 días. La estabilidad de cada muestra se evaluó en el tiempo de medición del día 7 para la turbidez. Los resultados demostraron que el uso de polisorbato 20 en la formulación final prevenía de forma eficaz la formación de agregados insolubles. Véase la Fig. 11.

EJEMPLO 8

[0315] Pertuzumab se preparó en las siguientes formulaciones:

- (1) Pertuzumab 25 mg/ml, histidina-HCl 10 mM, sacarosa 240 mM, pH 6,0;

- (2) Pertuzumab 50 mg/ml, histidina-HCl 10 mM, sacarosa 240 mM, pH 6,0;
 (3) Pertuzumab 60 mg/ml, histidina-acetato 20 mM, sacarosa 120 mM, pH 6,0.

[0316] Se añadieron diferentes cantidades de polisorbato 20 a cada formulación. Todas las muestras se cargaron en viales de vidrio de tipo I USP de 3 cc y se agitaron en horizontal a 70 rpm a temperatura ambiente hasta 7 días. La estabilidad de cada muestra se evaluó en el tiempo de medición del día 7 para la turbidez. Los resultados demostraron que el uso del polisorbato 20 en la formulación de histidina-HCl y sacarosa prevenía de forma eficaz la formación de partículas en suspensión insolubles. La formulación que contenía histidina-acetato y sacarosa parecía tener el mismo efecto protector en la proteína que el polisorbato 20. Véase la Fig. 12.

EJEMPLO 9

[0317] Pertuzumab se formuló como sigue:

- (1) proteína 100 mg/ml, histidina-HCl 10 mM, pH 6,0;
 (2) proteína 100 mg/ml, succinato 20 mM, pH 6,0;
 (3) proteína 60 mg/ml, histidina-acetato 20 mM, pH 6,0.

[0318] Cada formulación se mezcló con diferentes cantidades de sacarosa. Todas las muestras se cargaron de forma estéril en viales de vidrio de tipo I USP de 3 cc. Después se congelaron a -70 °C y se descongelaron a 5 °C tres veces. La estabilidad física de cada muestra se determinó después de 3 ciclos de congelación y descongelación. Los resultados demostraron que la sacarosa prevenía la formación de agregados solubles durante el procedimiento de congelación-descongelación. Véase la fig. 13.

EJEMPLO 10

[0319] La formulación de Pertuzumab preferida para uso terapéutico consiste esencialmente en Pertuzumab 30 mg/ml en acetato de histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, a pH 6,0.

Compuesto	Concentración	Cantidad/l
Pertuzumab	30 mg/ml	30 g
L-Histidina PM=155,16 g/mol	20 mM	3,10 g
Ácido acético glacial PM=60,05 g/mol Densidad=1,05 g/cm ³	11,6 mM	0,66 ml
Sacarosa PM=342,3 g/mol	120 mM	41,1 g
Polisorbato 20 Densidad=1,012 g/cm ³ PM: peso molecular	0,02 % (p/v)	0,2 ml

Configuración del vial de dosis de 420 mg:

Vial: 20 cc, vidrio tipo I Forma Vitrum
 Tapón: 20 mm DAIKYO GREY™, laminado de fluoro-resina
 Tapa: 20 mm, *flip-top* de aluminio
 Volumen de llenado: 14,50 ml
 Suministro: 14,0 ml de Pertuzumab en bolsa de disolución salina normal IV.

Configuración del vial de dosis de 1050 mg:

Vial: 50 cc, vidrio tipo I Forma Vitrum
 Tapón: 20 mm DAIKYO GREY™, laminado de fluoro-resina
 Tapa: 20 mm, *flip-top* de aluminio
 Volumen de llenado: 36,0 ml
 Suministro: 35,0 ml de Pertuzumab en bolsa de disolución salina normal IV.

EJEMPLO 11

[0320] Este ejemplo se refiere a otra formulación de Pertuzumab que se ha estado usando en ensayos clínicos en fase I y fase II. La composición consiste en Pertuzumab 25 mg/ml, tampón de histidina-HCl 10 mM, sacarosa 240 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 6,0.

Ingrediente	Concentración
Pertuzumab	25 mg/ml
L-His HCl.H ₂ O (PM 209,6)	1,12 mg/ml (0,0125 M)
L-His (PM 155,2)	0,72 mg/ml (0,0099 M)
Sacarosa (PM 342,3)	82,15 mg/ml (0,240 M)
Polisorbato 20	0,2 mg/ml (0,02 %)

EJEMPLO 12

[0321] La apoptosis celular es mediada por rutas intrínsecas y extrínsecas. La quimioterapia puede causar daño celular y puede desencadenar la apoptosis por la ruta intrínseca en respuesta al daño celular. Sin embargo, las células cancerosas a menudo desarrollan resistencia a la quimioterapia mediante mutaciones en el gen supresor de tumor p53 (Ashkenazi A. Targeting Death and Decoy Receptors of the Tumour-Necrosis Factor Superfamily. *Nature Reviews* 2: 420 – 430 (2002)). Los receptores de muerte, tales como DR4 y DR5, localizados en la superficie de las células desencadenan la apoptosis por la ruta extrínseca que no implica p53. Las moléculas agonistas, tales como Apo2L, se unen a los receptores DR4 y DR5 y activan las caspasas 8 y 10 a través del dominio de muerte asociado a Fas. Las caspasas 8 y 10 activan entonces las caspasas 3, 6 y 7 para inducir la apoptosis. La señalización molecular de los receptores de muerte en las células tumorales tiene potencial terapéutico para la eliminación de células cancerosas que son resistentes a las terapias convencionales y actualmente están en evaluación clínica moléculas tales como Apo2L.

[0322] “Apomab” es una IgG1 humanizada derivada de CHO de longitud completa construida con una cadena ligera lambda. Es un anticuerpo agonista contra DR5 que se ha mostrado que induce la apoptosis de diferentes líneas celulares de cáncer. Los estudios preclínicos usando un modelo de implante de tumor murino han mostrado que Apomab tiene una reducción tumoral similar o mejor comparada con Apo2L. Apomab se está evaluando como agente anticancerígeno en indicaciones de tumores sólidos avanzados y linfoma de no Hodgkin (NHL). Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de Apomab usadas en estos experimentos se muestran en las Figs. 27 y 28.

Preparación de formulaciones de anticuerpos

[0323] Apomab producido de forma recombinante tiene una concentración de proteínas muy diluida y pH alto. El material se concentró hasta aproximadamente 20 mg/ml y se intercambió en tampón de acetato sódico 20 mM, pH 5,0, usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) de Millipore LabScale con membrana de 50 cm MILLIPORE PELLICON™ XL, PLCGC10. Las muestras de Apomab se formularon en diferentes sistemas de tampón que cubrían un intervalo de pH de 4,0 a 7,0 usando acetato sódico, acetato de histidina y fosfato sódico sin trealosa ni TWEEN 20®, usando diálisis con una membrana con corte de exclusión de peso molecular 10.000 Da (Pierce, Inc). En la última diálisis se añadió trealosa 240 mM. Después de la diálisis, se añadió TWEEN 20™ al 0,02 % a la formulación y las muestras se filtraron con filtros de 0,22 µm (Millipore, Inc.). Se cargó un volumen de 0,5 ml de Apomab en viales de vidrio de 3 cc estériles (Forma Vitrum, Inc.) y se sellaron con tapones de 13 mm (Daikyo, Inc). La estabilidad de la proteína se evaluó a temperaturas de -70 °C, 5 °C, 30 °C y 40 °C con un almacenamiento hasta tres meses.

Estabilidad de la formulación de Apomab

[0324] Para ensayar la estabilidad del fármaco, Apomab formulado a granel, se cargó en viales de vidrio de 5 cc FORMA VITRUM®. Los viales se llenaron con 5,5 ml del anticuerpo formulado, se ajustaron con tapones de 20 mm DAIKYO®, y se almacenaron a -70 °C, 5 °C, 30 °C y 40 °C en posición vertical.

[0325] Para el ensayo de estabilidad del medicamento, Apomab formulado a granel se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 µm y se cargaron 10 ml en minidepósitos de acero inoxidable 316L de 20 cc tratados en autoclave. Los depósitos se pusieron en posición vertical a -20 °C y 5 °C. Se separó de forma aseptica una parte alícuota de 1 ml de los minidepósitos a intervalos de tiempo especificados para evaluar la calidad de la proteína. Los viales de control eran partes alícuotas de 1 ml en viales de vidrio de 3 cc almacenados a -20 °C.

Color, aspecto y transparencia

[0326] La transparencia, el aspecto y el color de las muestras se evaluaron de forma visual con luz fluorescente blanca usando una estación de inspección óptica con fondo negro y blanco. Para el análisis del fármaco, las muestras de los minidepósitos se transfirieron a una vial de vidrio de 3 cc para la inspección.

pH

[0327] El pH se midió a temperatura ambiente con semimicroelectrodos de pH THERMO ORION SURE-FLOW ROSS™ para medir tampones, o con microelectrodo de pH de combinación THERMO ORION GLS™ para medir muestras de proteína para selección de pH, una sonda de microelectrodo Beckman para las muestras para la estabilidad toxicológica. El medidor de pH/iones METERLAB™ pHM240 (Radiometer Analytical) se calibró cada día con referencias de tampones (EM Science) a pH 7 y pH 4.

Concentración

[0328] La concentración de proteína se determinó por espectroscopía de absorción ultravioleta usando un espectrofotómetro AGILENT 8453™. Las muestras se diluyeron con los blancos de tampones de formulación adecuados para dar una absorbancia de 0,5 a 1,0. El blanco para el instrumento era disolución de diluyente, y el espectro se midió de 240 a 500 nm. Se restó el valor de la absorbancia a 320 nm de la absorbancia a 279 nm para corregir el desplazamiento y la dispersión de luz. Las concentraciones de proteína se calcularon por la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. (mg/ml)} = \frac{(A_{279} - A_{320}) \times \text{factor de dilución}}{\text{coeficiente de absorción en cm}^{-1}(\text{mg/ml})^{-1}}$$

[0329] Se determinó inicialmente que el coeficiente de absorción basado en la secuencia era $1,32 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/ml})^{-1}$ y este valor se usó para los estudios de cribado de pH. Se determinó un valor posterior de $1,7 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/ml})^{-1}$ por análisis de aminoácidos y procedimientos de proteólisis y este valor se usó para el análisis de estabilidad de Apomab usado en los estudios toxicológicos.

Cromatografía de intercambio iónico

[0330] La cromatografía de intercambio iónico se llevó a cabo en un HPLC serie 1100 (Agilent Technologies, Inc.) equipado con un detector de matriz de diodos. La cromatografía se llevó a cabo en una columna PROPAC WCX-IO™ (Dionex) (4 x 250 mm) con un caudal de 0,5 ml/min y con una temperatura de la columna a 40 °C. La fase móvil A era fosfato sódico 25 mM, pH 6,5. La fase móvil B era cloruro sódico 100 mM en el mismo tampón que la fase móvil A. La columna se equilibró con la fase móvil A al 100 %. Para las muestras de selección de pH se cargó una cantidad de 20 mg de Apomab en la columna y la absorbancia se siguió a 214 nm. La proteína se eluyó de la columna con el siguiente gradiente.

Tiempo (min)	% de A	% de B
0	100	0
50	0	100
51	100	0
70	100	0

[0331] Para el análisis de estabilidad del material usado en los estudios toxicológicos, se cargó una cantidad de 30 mg de Apomab en la columna y la absorbancia se siguió a 280 nm. La proteína eluyó de la columna con el siguiente gradiente.

Gradiente: Tiempo (min)	% de A	% de B
0	100	0
40,0	40	60
41,0	0	100
45,0	0	100
45,1	100	0
60,0	100	0

Cromatografía de exclusión por tamaño molecular

[0332] La cromatografía de exclusión por tamaño molecular se llevó a cabo en un HPLC serie 1100 (Agilent Technologies, Inc.) equipado con un detector de matriz de diodos. Se cargó una cantidad de 50 µg de Apomab en una columna TSK Gel 3000SWXL™ (7,8 x 300 mm) y se desarrolló con un caudal de 0,9 ml/min durante 20 min para las muestras de selección de pH y 0,5 ml/min durante 30 min para las muestras de estabilidad toxicológica, con fosfato potásico 0,20 M, cloruro potásico 0,25 M, pH 6,2, como fase móvil. La absorbancia se siguió a 280 nm.

Potencia

[0333] El propósito del bioensayo de potencia era medir la capacidad de Apomab para matar células Colo205 usando ALAMARBLUE™. Colo205 es una línea celular de carcinoma de colon que expresa los receptores muerte

tanto DR5 como DR4. Este ensayo incorpora un indicador de crecimiento fluorométrico/colorimétrico basado en la detección de la actividad metabólica. ALAMARBLUE™ es un tinte rédox que es azul y no fluorescente en estado oxidado. La reducción metabólica intracelular lo convierte en un color rojo que también es fluorescente. Los cambios de color y de fluorescencia son proporcionales a la actividad metabólica y al número de células vivas. La señal disminuye cuando las células mueren. Apomab se diluyó en medio con anticuerpo dirigido contra Fc y después se añadieron células Colo205 a las muestras de Apomab y se incubaron a 37 °C durante 48 h. ALAMARBLUE™ se añade durante las últimas 2 – 3 h. La placa se leyó a 530 nm de excitación y 590 nm de emisión para dar unidades relativas de fluorescencia (URF). Los datos se analizaron por KALEIDAGRAPH™. Se generó una curva de dilución de la destrucción celular.

RESULTADOS

Estudio de selección de pH de la formulación

[0334] Se estudió el efecto del pH en la estabilidad del anticuerpo usando Apomab producido a partir de una línea celular estable no amplificada. Para este análisis, Apomab se formuló con 20 mg/ml de anticuerpo en tampón de acetato sódico 20 mM a pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5; tampón de acetato de histidina 20 mM a pH 6,0 y 6,5; y tampón de fosfato sódico 20 mM a pH 7,0. Todas las formulaciones contenían trealosa 240 mM y TWEEN 20® al 0,02 %. Las formulaciones se almacenaron hasta 3 meses a temperaturas de -70 °C, 5 °C, 30 °C y 40 °C, y se determinó la estabilidad de la proteína por diferentes ensayos analíticos, incluyendo CAT, pH, concentración, SEC e IEC. No se observaron cambios significativos en el CAT, pH o concentración de proteína durante el almacenamiento de las muestras.

[0335] El análisis de las muestras por SEC mostró que no se produjeron cambios significativos durante el almacenamiento a 5 °C y -70 °C. Sin embargo, se observó degradación con la formación de fragmentos de anticuerpo y agregados solubles producidos durante el almacenamiento a 30 °C y 40 °C (Fig. 20). Para comparar las formulaciones, se siguió la cinética del monómero del anticuerpo durante el almacenamiento y se calcularon las constantes de velocidad de primer orden. El perfil de tasa de pH obtenido para la pérdida de monómero de anticuerpo se muestra en la Fig. 21. Las condiciones óptimas para la estabilidad del monómero del anticuerpo se obtuvieron por formulación en tampón de acetato de histidina a pH 6,0.

[0336] La heterogeneidad de la carga de Apomab se siguió por IEC. No se produjeron cambios significativos en el perfil de IEC durante el almacenamiento a 5 °C y -70 °C. Sin embargo, se observó degradación con la formación de variantes ácidas o básicas producidas dependiente de la formulación (Fig. 22). En general, se formaron más variantes básicas con el pH de la formulación menor y se formaron más variantes ácidas con el pH de la formulación mayor. Para comparar las formulaciones, se siguió la cinética del pico principal por IEC durante el almacenamiento y se calcularon las constantes de velocidad de primer orden. El perfil de tasa de pH obtenido para la pérdida del pico principal en la IEC se muestra en la Fig. 23. Las constantes de velocidad observadas por IEC eran aproximadamente 10 veces mayores que las observadas por SEC (Fig. 21). Por lo tanto, la pérdida del pico principal en la IEC era la degradación principal del anticuerpo que en última instancia limitará la vida en anaquel del producto. Además, como se observaba por SEC, la estabilidad del anticuerpo óptima para estabilizar el pico principal de la IEC se obtuvo por formulación en tampón de acetato de histidina a pH 6,0.

[0337] Después del análisis de los datos de selección de pH descritos antes, se seleccionó una formulación de Apomab que comprendía 20 mg/ml de anticuerpo en acetato de histidina 20 mM, trealosa 240 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 6,0. Para el medicamento, la configuración del vial consistía en carga de 5,5 ml en un vial FORMA VITRUM™ con un tapón de 20 mm DAIKYO™ West. Apomab se almacenó en depósitos de acero inoxidable.

[0338] La estabilidad del medicamento de Apomab se evaluó en la configuración de vial de vidrio de 5 cc descrita antes. Los viales se almacenaron a -70 °C (controles), 5 °C, 30 °C y 40 °C. Se sacaron muestras a intervalos de tiempo específicos y se analizaron mediante los siguientes ensayos: color, aspecto, transparencia (CAT), pH, concentración de proteína, SEC, IEC y potencia. Los resultados de estos ensayos se muestran en la tabla 6 para las muestras almacenadas a -70 °C y 5 °C y en la tabla 7 para las muestras almacenadas a 30 °C y 40 °C.

Tabla 6. Datos de estabilidad para Apomab almacenado a -70 °C y 5 °C.

Temp. (°C)	Tiempo de medición	Transparencia	Color	pH	Concentración (mg/ml)	SEC (% monómero)	IEC (% pico principal)	Potencia (% actividad específica)
<i>Criterios de aceptación:</i>		<i>Informe</i>	<i>Informe</i>	$6,0 \pm 0,3$	20 ± 2	$\geq 95 \%$	<i>Informe</i>	$60 - 140 \%$
NE	T=0	Transparente	Incoloro	5,9	20,2	99,8	63	94
-70	1 mes	Transparente	Incoloro	6,0	20,5	99,8	63	86
-70	2 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,4	99,7	64	91
-70	3 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,5	99,7	63	83
-70	6 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,4	99,7	64	85
-70	9 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,4	99,8	65	89
-70	12 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,8	99,7	63	107
5	1 mes	Transparente	Incoloro	6,0	20,5	99,7	63	89
5	2 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,4	99,7	64	99
5	3 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,6	99,7	63	84
5	6 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,5	99,7	64	93
5	9 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,6	99,7	64	88
5	12 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,7	99,6	64	106

Tabla 7. Datos de estabilidad para Apomab almacenado a 30 °C y 40 °C.

Temp. (°C)	Tiempo de medición	Transparencia	Color	pH	Concentración (mg/ml)	SEC (% de monómero)	IEC (% pico principal)	Potencia (% actividad específica)
<i>Criterios de aceptación:</i>		<i>Informe</i>	<i>Informe</i>	$6,0 \pm 0,3$	20 ± 2	$\geq 95 \%$	<i>Informe</i>	$60 - 140 \%$
30	1 mes	Transparente	Incoloro	6,0	20,6	98,2	59	91
30	2 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,3	97,4	54	80
30	3 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,6	97,2	49	74
30	6 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,2	94,1	37	51
30	9 meses	Transparente	Ligeramente amarillo	6,0	20,4	93,2	31	55
30	12 meses	Transparente	Ligeramente amarillo	6,0	20,6	91,6	25	59
40	1 mes	Transparente	Incoloro	6,0	20,4	96,6	44	79
40	2 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,0	93,7	31	64
40	3 meses	Transparente	Ligeramente amarillo	5,9	20,3	91,5	22	53
40	6 meses	Transparente	Ligeramente amarillo	6,0	20,2	83,9	NE	26
40	9 meses	Transparente	Amarillo	5,9	20,3	78,8	NE	25
40	12 meses	Transparente	Amarillo	5,9	20,5	71,4	NE	31

NE = no ensayado

5

10

15

20

[0339] No se observaron cambios en la calidad de la proteína después de 12 meses de almacenamiento a -70 °C y 5 °C. Por ejemplo, el pH permaneció en $6,0 \pm 0,3$, Apomab aparecía como un líquido transparente e incoloro, la concentración de proteína permanecía en $20,0 \pm 2,0$ mg/ml, y el % de monómero no cambiaba. Además, no había cambios significativos en el % del pico principal de la IEC y el % de actividad específica determinada por el ensayo de la potencia de destrucción celular estaba dentro de la precisión del ensayo de 60 % a 140 % de actividad específica. Los resultados mostraron que Apomab almacenado en viales de vidrio de 5 cc era estable durante al menos 12 meses a 5 °C.

[0340] La tabla 7 muestra los cambios en la calidad de la proteína que se produjeron a 30 °C y 40 °C. La SEC mostró una disminución del % de monómero con un aumento principalmente en especies de fragmentos. También aumentaron los agregados a temperatura más alta, pero la velocidad era mucho menor. Sin embargo, los agregados aumentaron significativamente después de 6 meses a 40 °C. El % de pico principal en IEC disminuyó con un aumento correspondiente de las variantes ácidas. Los picos básicos disminuyeron ligeramente después de 2 meses a 40 °C y 9 meses a 30 °C. Después de 6 meses de almacenamiento a 40 °C, se produjo la degradación en una extensión tal que el pico principal de la IEC ya no se podía integrar. El bioensayo de destrucción celular mostró pérdida del % de actividad específica a temperatura más alta con tiempo de almacenamiento más largo. La

concentración de proteína y el pH no cambiaron. La disolución se vuelve ligeramente amarilla después de 3 meses a 40 °C y 9 meses a 30 °C y se vuelve amarilla después de 9 meses a 40 °C.

Estabilidad del fármaco

[0341] Los datos de estabilidad de congelación-descongelación para el fármaco se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Datos de estabilidad de congelación-descongelación para Apomab cargado en depósitos miniatura de acero inoxidable

Temp (°C) (congelación/ descongelación)	Nº de ciclos de congelación- descongelación	Transparencia	Color	pH	Concentración (mg/ml)	SEC (% monómero)
<i>Criterios de aceptación:</i>		<i>Informe</i>	<i>Informe</i>	6,0 ± 0,3	20,0 ± 2,0	≥ 95 %
Control (no congelado)	0	Transparente	Incoloro	6,0	20,9	99,6
-20/25	1	Transparente	Incoloro	6,0	20,8	99,6
-20/25	2	Transparente	Incoloro	6,0	20,8	99,6
-20/25	3	Transparente	Incoloro	6,0	20,9	99,6

Tabla 9. Datos de estabilidad para Apomab cargado en depósitos miniatura de acero inoxidable

Temp. (°C)	Tiempo de medición	Transparencia	Color	pH	Concentración (mg/ml)	SEC (% de monómero)	IEC (% pico principal)	Potencia (% actividad específica)
<i>Criterios de aceptación:</i>		<i>Informe</i>	<i>Informe</i>	6,0 ± 0,3	20 ± 2	≥ 95 %	<i>Informe</i>	60 – 140 %
NE	T = 0	Transparente	Incoloro	5,9	20,0	99,7	63	88
-20	1 mes	Transparente	Incoloro	6,0	20,6	99,7	63	107
-20	3 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,6	99,7	63	82
-20	6 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,3	99,7	64	92
-20	9 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,6	99,7	64	92
-20	12 meses	Transparente	Incoloro	6,0	21,2	99,7	65	94
5	1 mes	Transparente	Incoloro	6,0	20,5	99,7	62	95
5	3 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,7	99,6	62	71
5	6 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,4	99,5	62	84
5	9 meses	Transparente	Incoloro	6,0	20,8	99,4	61	84
5	12 meses	Transparente	Incoloro	6,0	21,3	99,2	59	82

No se observaron cambios significativos en las características químicas de la proteína después de ser congelada a -20 °C durante al menos 15 h y descongelada a temperatura ambiente 3 veces. Por ejemplo, Apomab aparecía como un líquido transparente e incoloro, el pH permanecía a 6,0 ± 0,3, y el porcentaje del pico de monómero en la SEC no cambiaba.

[0342] La estabilidad de Apomab en recipientes de acero inoxidable se evaluó a -20 °C y 5 °C (Tabla 9).

[0343] Se sacaron muestras de forma aséptica de los minidepósitos a intervalos específicos y se analizaron.

[0344] Apomab no mostró cambio en la calidad de la proteína a 5 °C con respecto al pH, CAT, concentración de proteína y % del pico principal por IEC, pero perdía 0,1 % de monómero por SEC cada 3 meses. Se observó una disminución de la potencia durante el almacenamiento a 5 °C durante 3 meses. Sin embargo, la potencia de la muestra volvía a aumentar en los tiempos de medición de 6 y 9 meses. Por lo tanto, la diferencia de potencia observada en el tiempo de medición de 3 meses se atribuyó a la variación del ensayo. Apomab no mostró cambio en la calidad de la proteína a -20 °C con respecto al pH, CAT, concentración de proteína, % de monómero por SEC, % de pico principal por IEC, ni cambio significativo en la potencia. Los datos de estabilidad muestran que Apomab era estable durante al menos 1 año a -20 °C y 3 meses a 5 °C.

CONCLUSIÓN

[0345] Los estudios de selección de formulación se llevaron a cabo para seleccionar una formulación para Apomab. Una selección de pH que cubría el intervalo de pH de 4,0 a 7,0 usando acetato sódico, acetato de histidina

- 5 y fosfato sódico como tampones, con trealosa dihidrato 240 mM y polisorbato 20 al 0,02 %, mostró que Apomab es más estable en disolución a pH 6,0. Por lo tanto, se desarrolló una formulación que consistía en acetato de histidina 20 mM, trealosa 240 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 6,0 y se demostró experimentalmente que era estable. Usando esta formulación, se mostró que Apomab era estable durante al menos 12 meses a 5 °C. Además, se mostró que Apomab era estable durante al menos 12 meses a -20 °C y 3 meses a 5 °C cuando se almacenaba en recipientes de acero inoxidable 316L. También se mostró que Apomab era estable cuando se sometía hasta a 3 ciclos de congelación/descongelación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulaci3n farmac3utica que comprende pertuzumab en una concentraci3n de 20 mg/ml a 40 mg/ml, tamp3n de histidina-acetato en una concentraci3n de 10 mM a 40 mM, sacarosa en una concentraci3n de 60 mM a 250 mM y polisorbato 20 en una concentraci3n de 0,01 % a 0,1 %, en la que el pH de la formulaci3n es de 5,5 a 6,5, y en la que el pertuzumab comprende las secuencias de amino3cidos variable ligera y variable pesada mostradas como SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente.
- 10 2. Formulaci3n farmac3utica, seg3n la reivindicaci3n 1, en la que el pertuzumab comprende una secuencia de amino3cidos de la cadena ligera mostrada como SEQ ID NO: 15 y una secuencia de amino3cidos de la cadena pesada mostrada como SEQ ID NO: 16.
3. Formulaci3n farmac3utica, seg3n la reivindicaci3n 1 3 2, en la que el pH de dicha formulaci3n es de 5,8 a 6,2.
- 15 4. Formulaci3n farmac3utica, seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulaci3n comprende pertuzumab 30 mg/ml, histidina-acetato 20 mM, sacarosa 120 mM y polisorbato 20 al 0,02 %, en la que el pH de la formulaci3n es 6,0.
- 20 5. Formulaci3n farmac3utica, seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar la formulaci3n a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o trastorno.
- 25 6. Formulaci3n farmac3utica, seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso en un procedimiento para tratar el c3ncer, comprendiendo el procedimiento administrar la formulaci3n a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar el c3ncer.
7. Formulaci3n farmac3utica para su uso, seg3n la reivindicaci3n 6, en la que el c3ncer es un c3ncer que expresa HER2.

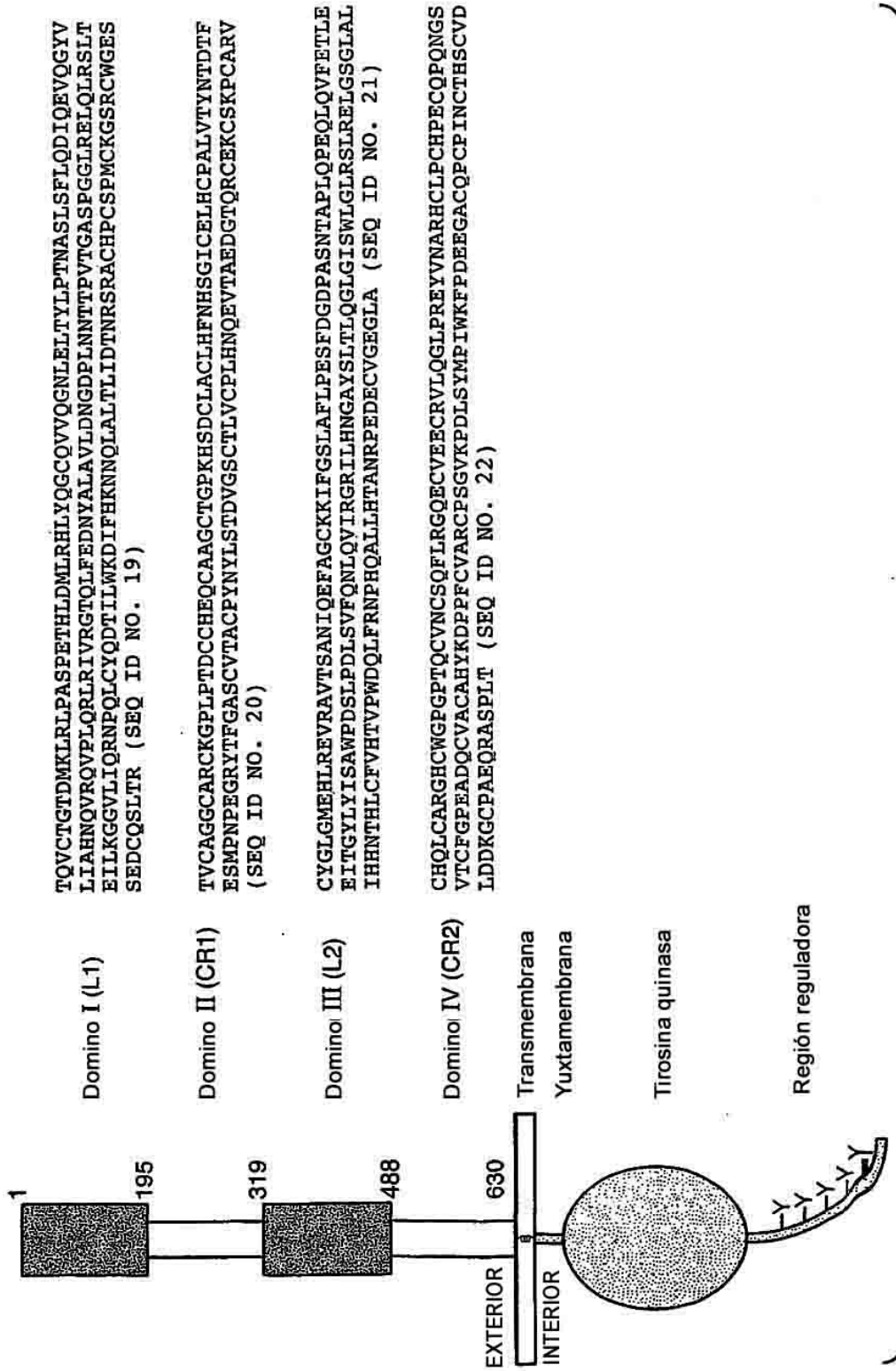


FIG. 1

Variable ligera

		10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQRP		
	** * * * *	*	*		
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQKP		
		* * * *			
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP		
		50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA			
	** * * * *	* *	*	*	*
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQP			
	* * * * *				
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQP			
		90	100		
2C4	EDLAVYYC [QYYIYPYT]	FGGKLEIK (SEQ ID NO:1)			
	* *	*	*		
574	EDFATYYC [QYYIYPYT]	FGQKVEIK (SEQ ID NO:3)			
	* * * *				
hum κI	EDFATYYC [QYNSLPWT]	FGQKVEIK (SEQ ID NO:5)			

FIG. 2A

Variable pesada

		10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS		
	** * * * *	*	*		
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA		
			** * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA		
		50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM			
	* * * *		* * *	* * *	*
574	PGKLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL			
	* * * * *	* * *			
hum III	PGKLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL			
		abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:2)		
	* * *		*		
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGLVTVSS (SEQ ID NO:4)		
		* * * * *			
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGLVTVSS (SEQ ID NO:6)		

FIG. 2B

Secuencia de aminoácidos para la cadena ligera de Pertuzumab

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQOKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
|      |      |      |      |      |      |
70     80     90     100    110    120
|     |     |     |     |     |     |
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
|     |     |     |     |     |     |
130    140    150    160    170    180
|    |    |    |    |    |    |
SDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
|    |    |    |    |    |    |
190    200    210
|    |    |
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
    
```

FIG. 3A

Secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de Pertuzumab

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY
|      |      |      |      |      |
70     80     90     100    110    120
|     |     |     |     |     |
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSA
|     |     |     |     |     |
130    140    150    160    170    180
|    |    |    |    |    |
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
|    |    |    |    |    |
190    200    210    220    230    240
|    |    |    |    |    |
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
|    |    |    |    |    |
250    260    270    280    290    300
|    |    |    |    |    |
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
|    |    |    |    |    |
310    320    330    340    350    360
|    |    |    |    |    |
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
|    |    |    |    |    |
370    380    390    400    410    420
|    |    |    |    |    |
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
|    |    |
430    440    448
|    |    |
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
    
```

FIG. 3B

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S 45
46 Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F 90
91 T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F 135
136 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E 180
181 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T 225
226 K S F N R G E C (SEQ ID NO. 17) 233

FIG. 4A

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G 45
 46 F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F F K G R F T L S 90
 91 V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T 135
 136 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N 180
 181 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H 225
 226 K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D 270
 271 T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E 315
 316 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A 360
 361 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N 405
 406 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R R W Q Q G N V F S C S V M H 450
 451 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (SEQ ID NO. 18) 465

FIG. 4B

EGFR activado por ligando heterodimeriza con HER2, 2C4 se une al sitio de unión heterodímero

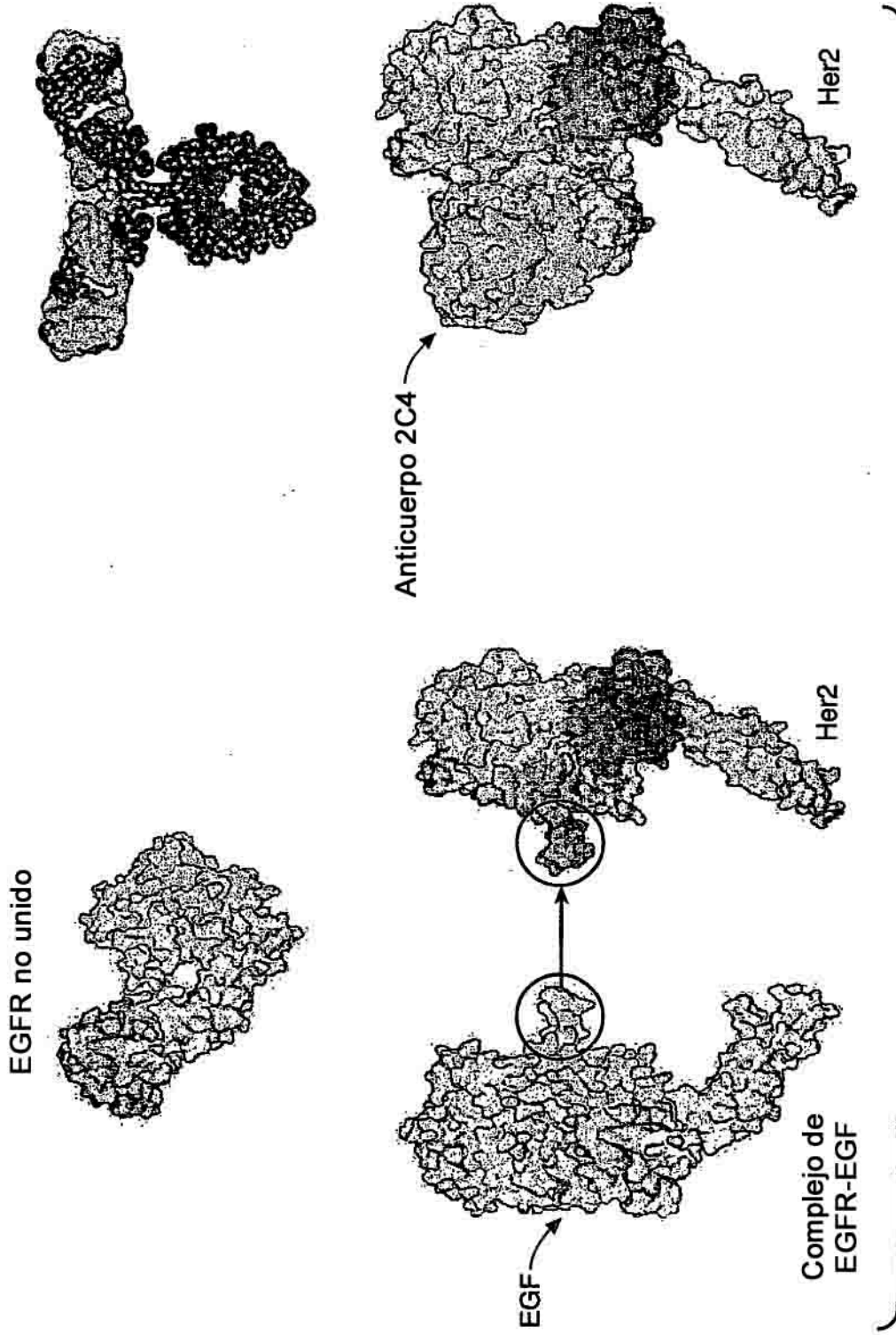


FIG. 5

Acoplamiento de HER2/3 a las rutas de MAPK y Akt

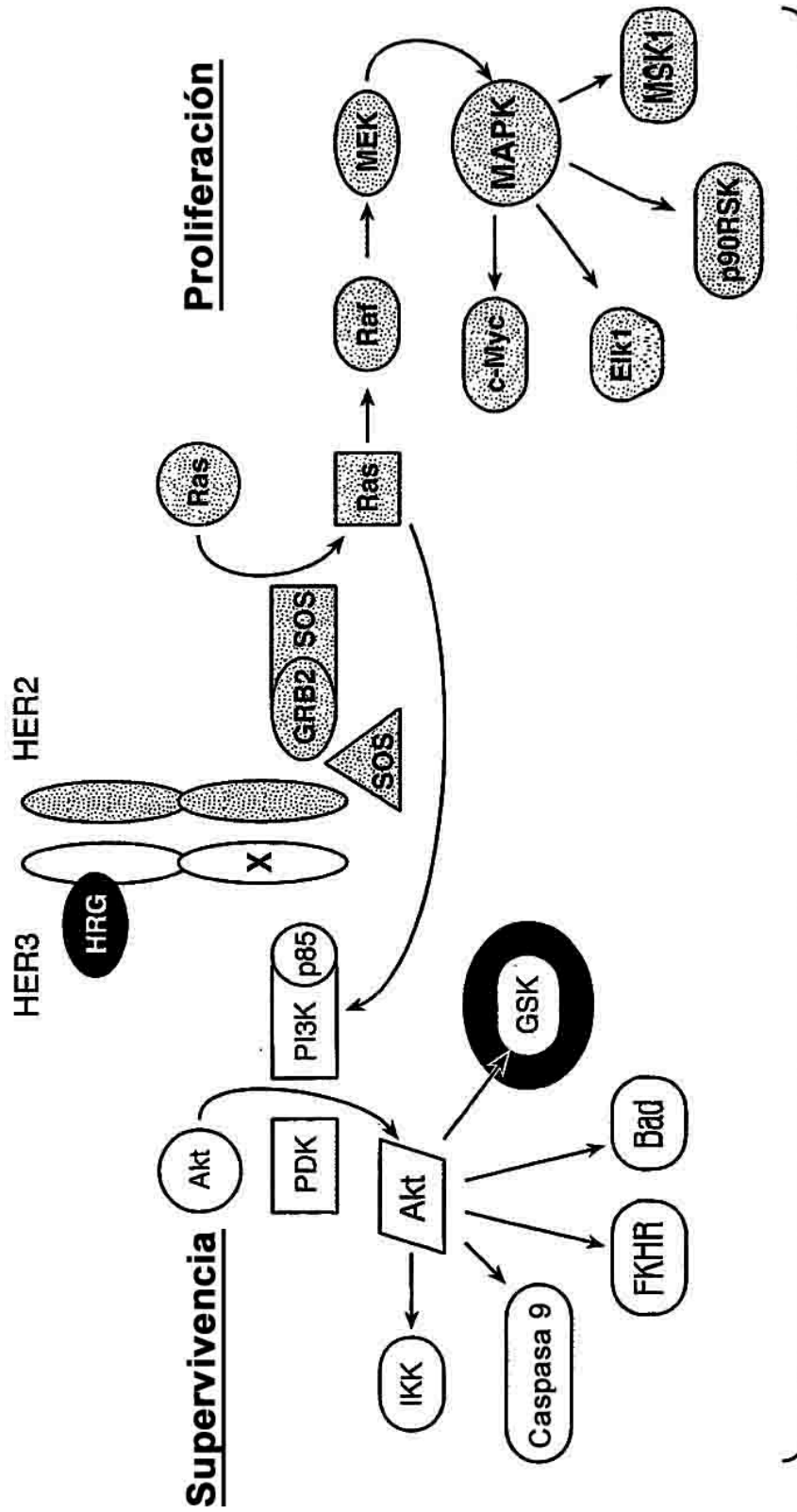
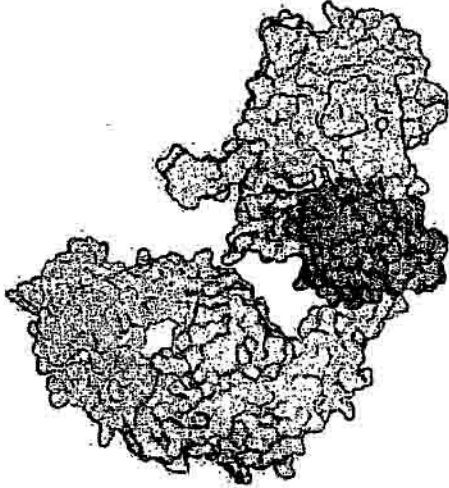


FIG. 6

**Trastuzumab
Herceptin**



- Se une en IV cerca de JM.
- Protege frente a la liberación del receptor
- Afecta moderadamente a la modulación por disminución del receptor
- Efecto ligero en la función de HER2 como correceptor

**Pertuzumab
Omnitarg**



- Se une en II en la interfase de dimerización
- No previene la liberación del receptor
- Afecta moderadamente a la modulación por disminución del receptor
- Efecto importante en la función de HER2 como correceptor

FIG. 7

Análisis de la Cinética de Pseudoprimer Orden del Pico Principal de IEX

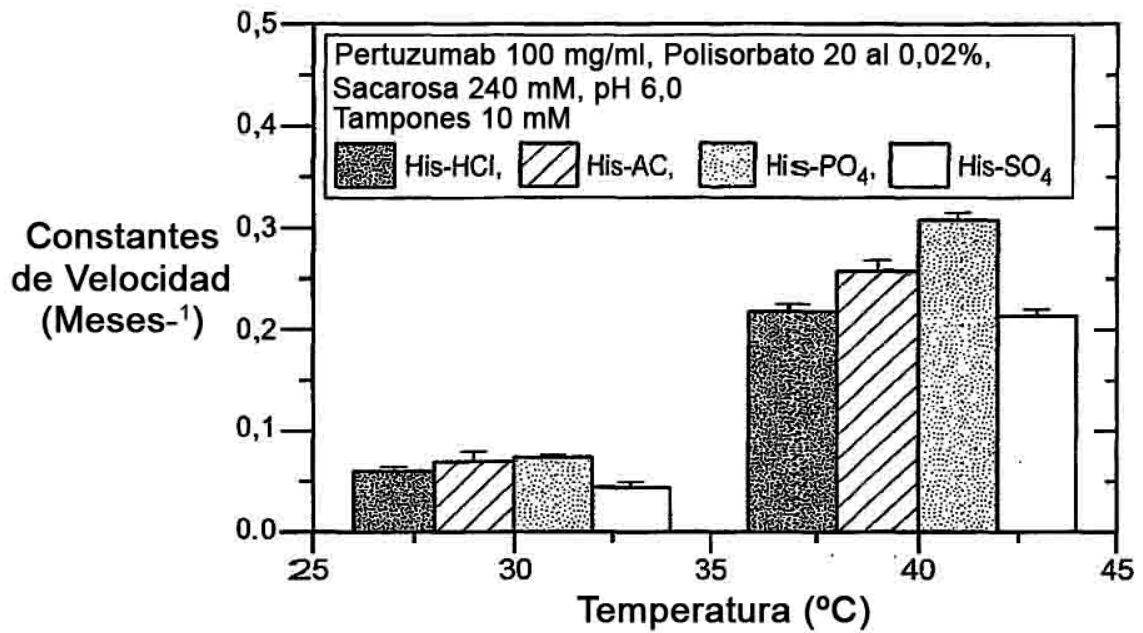


FIG. 8

Análisis de la Cinética de Pseudoprimer Orden del Pico Principal de SEC

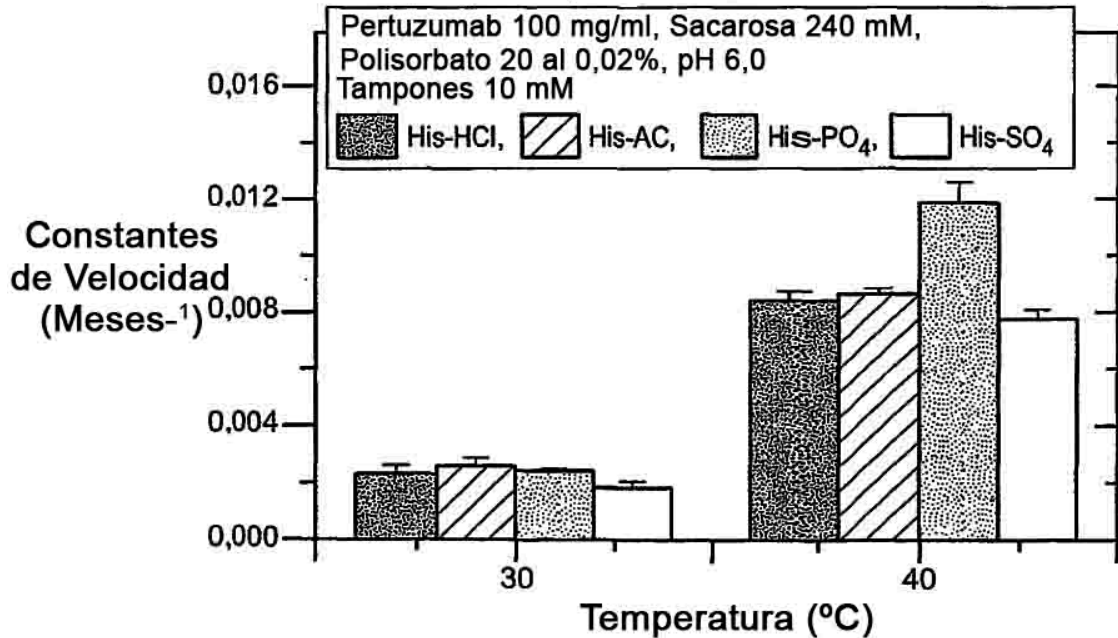


FIG. 9

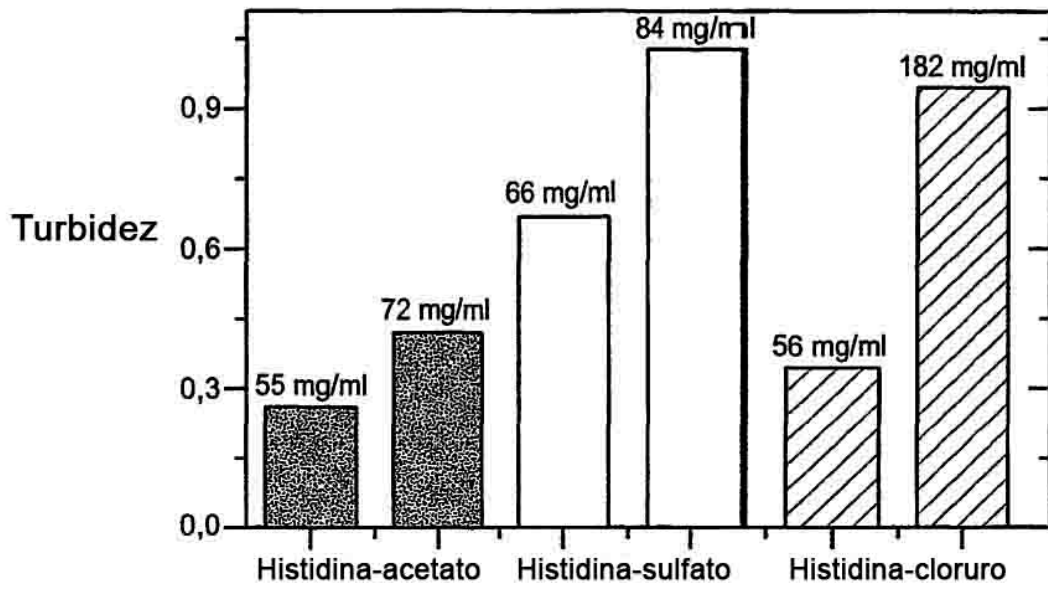


FIG. 10

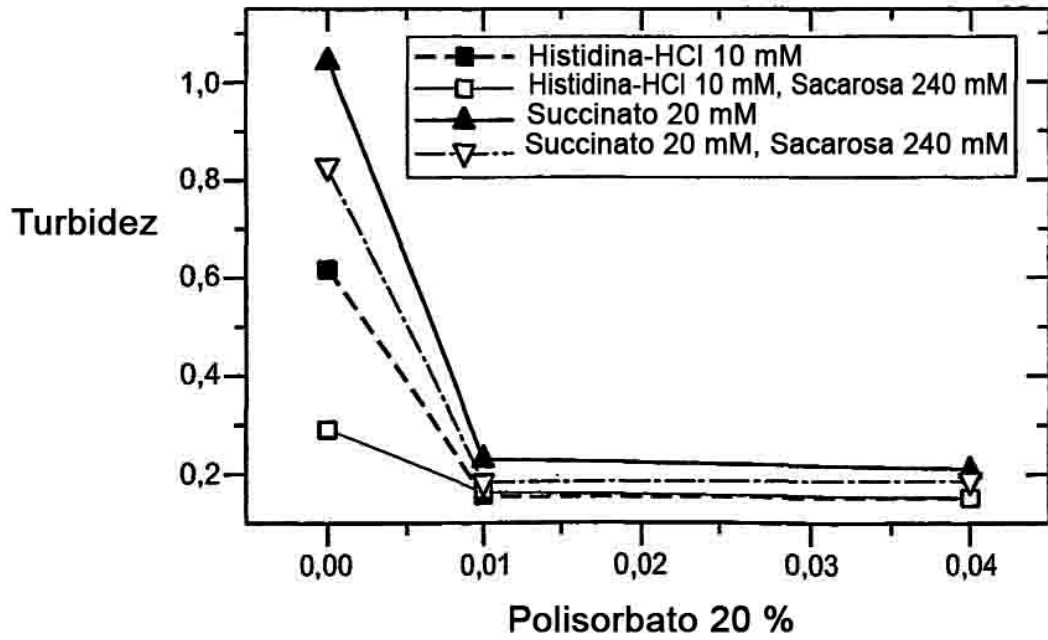


FIG. 11

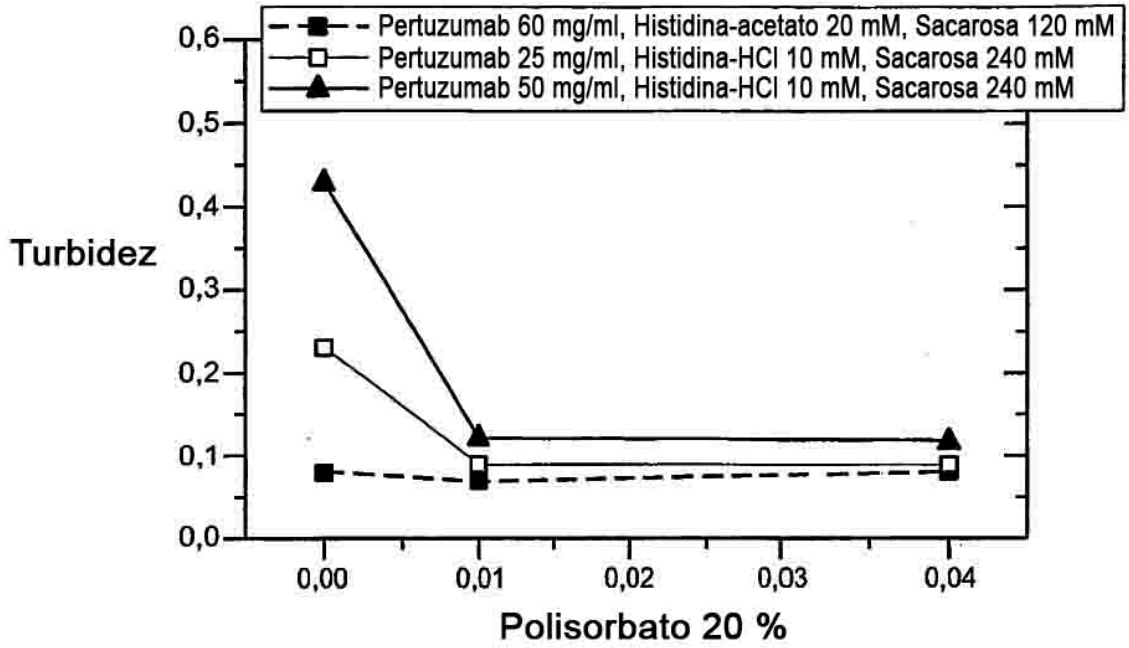


FIG. 12

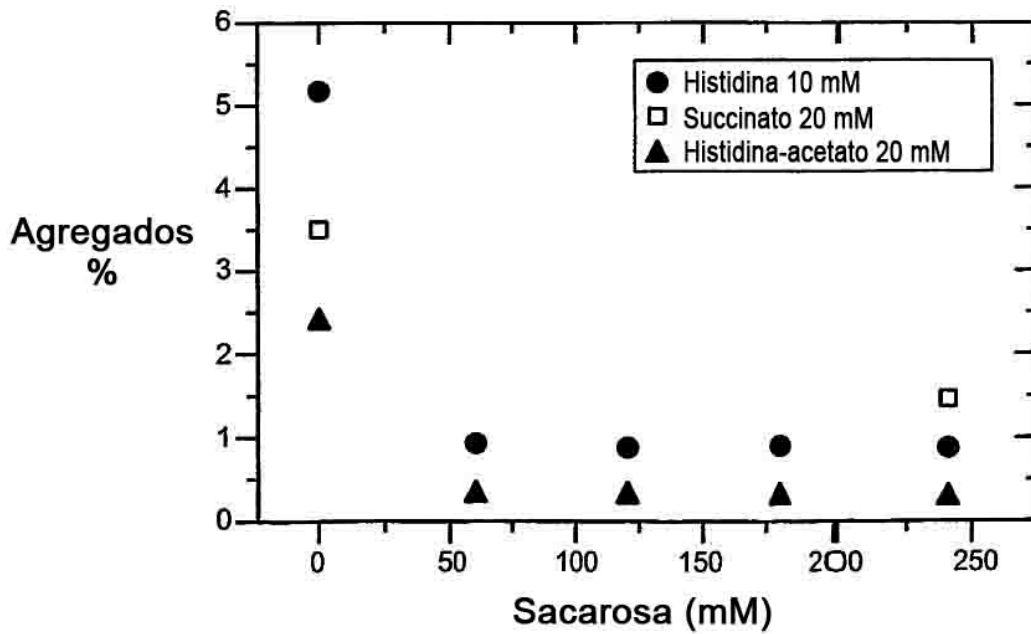


FIG. 13

Cadena pesada

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFNIKDTYIHWV RQAPGKGL 30 45
 46 EWVARIYPTNGYTR YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AED 75 90
 91 TAVYYSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGP SVFFLAPSS 120 135
 136 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS G VHTFPAVLQSS 165 180
 181 GLYSLSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDK 210 225
 226 THTCPCPAP ELLGGP S VFLFPKPKD TLMISR TP E V T C V V D V S 255 270
 271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNS T Y R V V S V L T V L H Q D 300 315
 316 WLN GK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREE 345 360
 361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTT P P V L D S D G 390 405
 406 SFFLYSKLTVDKSRWQQG N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G 435 449

FIG. 14B

FIG. 16A

Estructuras de oligosacáridos observadas normalmente en anticuerpos IgG

<u>Estructuras</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Masa</u>
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$	Man5	1235
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2) \\ \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \right. \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$ <p style="text-align: center; margin-left: 100px;">Fuc$\alpha(1\rightarrow6)$</p>	G-1	1260
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$	G0-F	1317
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$	Man6	1398

Estructuras de oligosacáridos observadas normalmente en anticuerpos IgG

<u>Estructuras</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Masa</u>
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\left\{\begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array}\right\} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G1-1	1423
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)$ $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)$ $\text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G0	1463
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)$ $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)$ $\text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G1 (1-6)	1626
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)$ $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)$ $\text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G1 (1-3)	1626
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)$ $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)$ $\text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G2	1788

Las masas mostradas en esta figura corresponden a los valores de (M+Na)+

FIG. 16B

Anticuerpos dirigidos contra IgE: Cadena ligera (Dominios V_L y C_L)

	10	20	30	40	50	60	70	80
E25	DIQLTQSPSS	LSASVGRVVT	ITC[RASQSDV	YDGSYMN]WY	QOKPGKAPKL	LIY[AASYLES]	GVPSRFGSG	SGTDFLLTIS
E26	DIQLTQSPSS	LSASVGRVVT	ITC[RASKPVD	GEGSYLN]WY	QOKPGKAPKL	LIY[AASYLES]	GVPSRFGSG	SGTDFLLTIS
HAE1	DIQLTQSPSS	LSASVGRVVT	ITC[RASKPVD	GEGSYLN]WY	QOKPGKAPKL	LIY[AASYLES]	GVPSRFGSG	SGTDFLLTIS
Hu-901	DITLTQSHGT	LSLSGERAT	LSC RASOSIG	TNIH---	WY QOKPGAPRL	LTK VASESIS	GIPSRFGSG	SGTDFLLTIS
	90	100	110	empieza C _L				
E25	SLQPEDFATY	YC[QOSHEDPY	T]FGQGTKVEI	KRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV	VVCLLN	FNFPY	PREAKVQWKVDNAL	QSGNSQESVTEQD
E26	SLQPEDFATY	YC[QOSHEDPY	T]FGQGTKVEI	KRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV	VVCLLN	FNFPY	PREAKVQWKVDNAL	QSGNSQESVTEQD
HAE1	SLQPEDFATY	YC[QOSHEDPY	T]FGQGTKVEI	KRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV	VVCLLN	FNFPY	PREAKVQWKVDNAL	QSGNSQESVTEQD
Hu-901	RIPEDFATY	YC QOSDSWFI	T FGQGTKVEI	KRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV	VVCLLN	FNFPY	PREAKVQWKVDNAL	QSGNSQESVTEQD
E25	SKDSTYLSSTL	TL	SKADYEKHKVYACEVTH	QGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO.:	37		
E26	SKDSTYLSSTL	TL	SKADYEKHKVYACEVTH	QGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO.:	38		
HAE1	SKDSTYLSSTL	TL	SKADYEKHKVYACEVTH	QGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO.:	39		
Hu-901	SKDSTYLSSTL	TL	SKADYEKHKVYACEVTH	QGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO.:	40		

FIG. 17A

Anticuerpos dirigidos contra IgE: Cadena pesada (Dominios V_H y C_H)

	10	20	30	40	50 a	60	70	80	90		
E25	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVGSYIT	SIGYSNNW	IRQ	APGKGLEWVA	[SITYDGSINY	NPSYKGI	RITL	SRDDSKNTFY	LQMNLSRAED
E26	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVGSYIT	SIGYSNNW	IRQ	APGKGLEWVA	[SITYDGSINY	NPSYKGI	RITL	SRDDSKNTFY	LQMNLSRAED
HAE1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVGSYIT	SIGYSNNW	IRQ	APGKGLEWVA	[SIKYSGEIKY	NPSYKGI	RITL	SRDDSKNTFY	LQMNLSRAED
Hu-901	QVQLVQSGAE	VKRPQASVKV	SKASGIT- s	MMWLEW	VRQ	APCEGLEWVQ	EISPGITINY	NEKDKA	RAPE	TADTSNTAV	MELSLRSIED
	100	110ab	empieza C _H								
E25	TAVYYCAR	[GS HYFGHWHFAV]	WGQGLVTVSS	ASTKGPSVFLP	APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV	VTVSWNSGALTS	GVHTFP	PAVLQSSGLYSLS			
E26	TAVYYCAR	[GS HYFGHWHFAV]	WGQGLVTVSS	ASTKGPSVFLP	APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV	VTVSWNSGALTS	GVHTFP	PAVLQSSGLYSLS			
HAE1	TAVYYCAR	[GS HYFGHWHFAV]	WGQGLVTVSS	ASTKGPSVFLP	APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV	VTVSWNSGALTS	GVHTFP	PAVLQSSGLYSLS			
Hu-901	TAVYYCAR	[ES HFSGSNYDYFDY]	WGQGLVTVSS	ASTKGPSVFLP	APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV	VTVSWNSGALTS	GVHTFP	PAVLQSSGLYSLS			
E25	VTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK	KKVEPKCDKTH	TCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD	ITLMISRTPEVTCV	VVDSHEDPEV	KFNWYVDGVE					
E26	VTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK	KKVEPKCDKTH	TCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD	ITLMISRTPEVTCV	VVDSHEDPEV	KFNWYVDGVE					
HAE1	VTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK	KKVEPKCDKTH	TCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD	ITLMISRTPEVTCV	VVDSHEDPEV	KFNWYVDGVE					
Hu-901	VTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK	KKVEPKCDKTH	TCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD	ITLMISRTPEVTCV	VVDSHEDPEV	KFNWYVDGVE					
E25	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL	HOHWLNGKEYCKVSNKALPAPIEK	TKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE							
E26	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL	HOHWLNGKEYCKVSNKALPAPIEK	TKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE							
HAE1	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL	HOHWLNGKEYCKVSNKALPAPIEK	TKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE							
Hu-901	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL	HOHWLNGKEYCKVSNKALPAPIEK	TKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE							
E25	SNQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL	TVDKSRWQGNVFC	SYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ	ID NO.:	41					
E26	SNQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL	TVDKSRWQGNVFC	SYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ	ID NO.:	42					
HAE1	SNQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL	TVDKSRWQGNVFC	SYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ	ID NO.:	43					
Hu-901	SNQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL	TVDKSRWQGNVFC	SYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ	ID NO.:	44					

FIG. 17B

Alineamiento de secuencias de dominios ligeros variables

	-----FR1-----	CDR1	-----
	10 20 30 40		
2H7	QIVLSQSPAILSASPGKEKVTMTC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
	* * * * * * * * * * *		
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
		* * * * *	
hum kI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP
	-----FR2-----	CDR2	-----FR3-----
	50 60 70 80		
2H7	GSSPKPWIY [APSNLAS]	GVPARFSGSGSGTSLTISRVEA	
	* * *	*	* * * * *
hu2H7.v16	GKAPKPLIY [APSNLAS]	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP	
	* * * * *		
hum kI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP	
	-----	CDR3	-----FR4-----
	90 100		
2H7	EDAATYYC [QQWSFNPPT]	FGAGTKLELKR	
	*	* * * *	
hu2H7.v16	EDFATYYC [QQWSFNPPT]	FGQGTKVEIKR	
		* * * * *	
hum kI	EDFATYYC [QYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR	

FIG. 18A

Alineamiento de secuencias de dominios pesados variables

	-----FR1-----	CDR1	-----
	10 20 30 40		
2H7	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS	[GYTFTSYNMH]	WVKQT
	* * * * * * * * * * * *		* * *
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFTSYNMH]	WVRQA
		* * * * *	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA
	-----FR2-----	CDR2	-----FR3-----
	50 60 70 80		
2H7	PRQGLEWIG [AI YPGNGDTSYNQKFKG]	KATLTVDKSSSTAYM	
	* * *	* * * * *	* * * * *
hu2H7.v16	PGKGLEWVG [AI YPGNGDTSYNQKFKG]	RFTISVDKSKNTLYL	
	* * * * * * * * * * *		* * *
hum III	PGKGLEWVA [VI SGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL	
	-----	CDR3	-----FR4-----
	abc 90 100abcde 110		
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR	[VVYYSNSYWYFDV]	WGTGTTVTVSS
	* * * * *		*
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYFCAR	[VVYYSNSYWYFDV]	WGQGLVTVSS
		* * * * * * * * * *	
hum III	QMNSLRAEDTAVYFCAR	[GRVGYSLY---DY]	WGQGLVTVSS

FIG. 18B

Secuencias del dominio variable de anticuerpos dirigidos contra VEGF

Secuencia ligera variable del anticuerpo dirigido contra VEGF:

DIQMTQTSSLSASLGDRVVIISCSASQDISNYLNWYQOKPDGTVKVLIIYFTSSSLHSGVPSRFSGS
GSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQOYSTVPWTFGGGKLEIK
(SEQ ID NO: 31)

Secuencia ligera variable del anticuerpo dirigido contra VEGF:

EIQLVQSGPELKQPGETVRISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTY'TGEPTYAADFK
RRFTFSLETSASTAYLQISNLKNDDTATYFCAKYPHYYGSSHWFVWVGAGTTV'TVSS
(SEQ ID NO: 32)

Secuencia ligera variable del anticuerpo dirigido contra VEGF:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQOKPGKAPKVLIIYFTSSSLHSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQOYSTVPWTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO: 33)

Secuencia pesada variable del anticuerpo dirigido contra VEGF:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTY'TGEPTYAADFK
RRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWFVWVGQGLV'TVSS
(SEQ ID NO: 34)

Secuencia ligera variable del anticuerpo dirigido contra VEGF:

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQOKPGKAPKVLIIYFTSSSLHSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQOYSTVPWTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO: 35)

Secuencia pesada variable del anticuerpo dirigido contra VEGF:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDF'THYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTY'TGEPTYAADFK
RRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWFVWVGQGLV'TVSS
(SEQ ID NO: 36)

FIG. 19

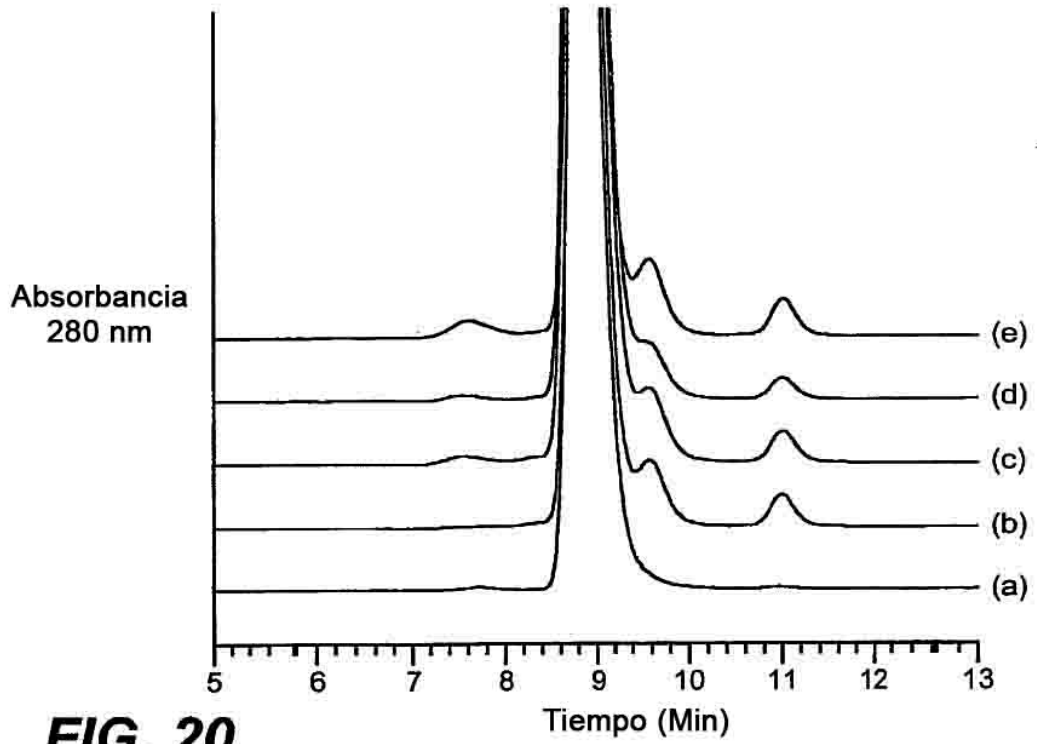


FIG. 20

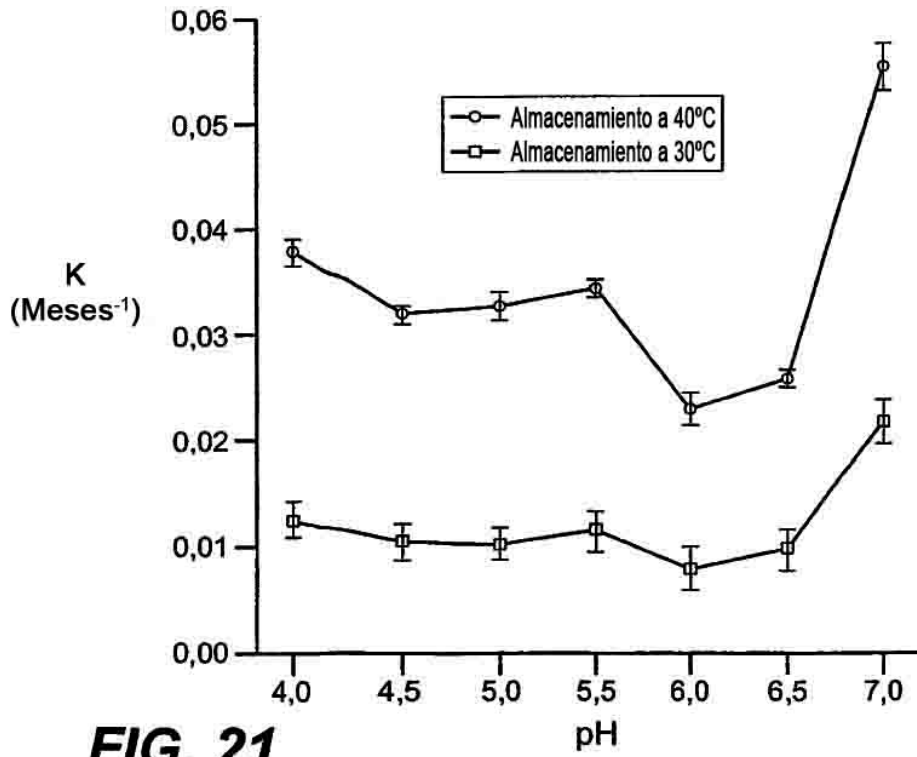
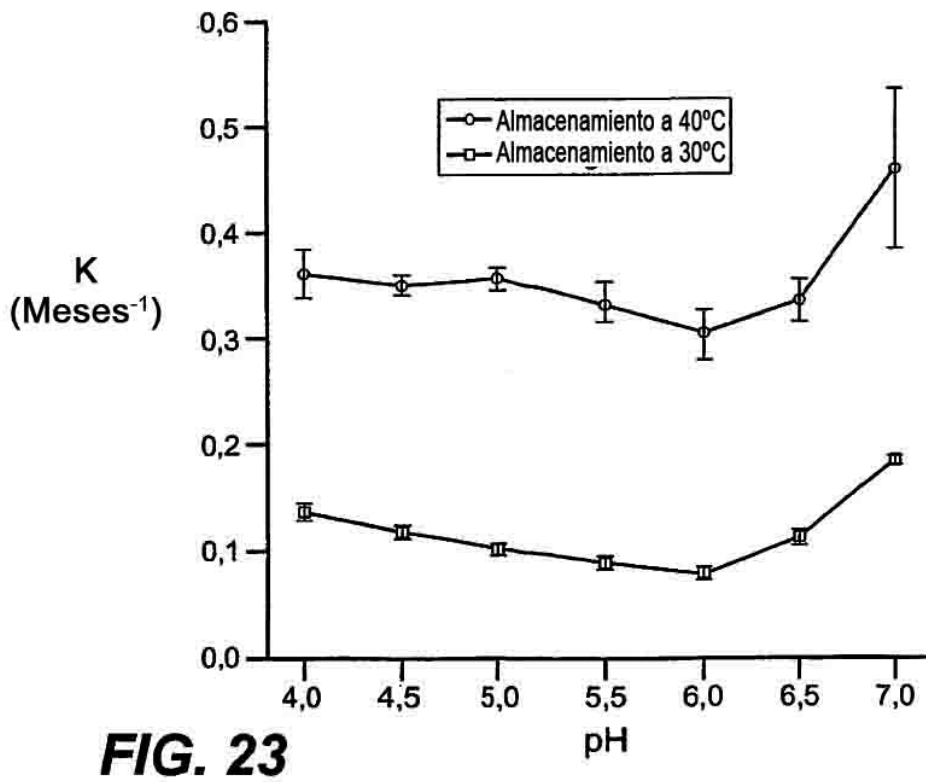
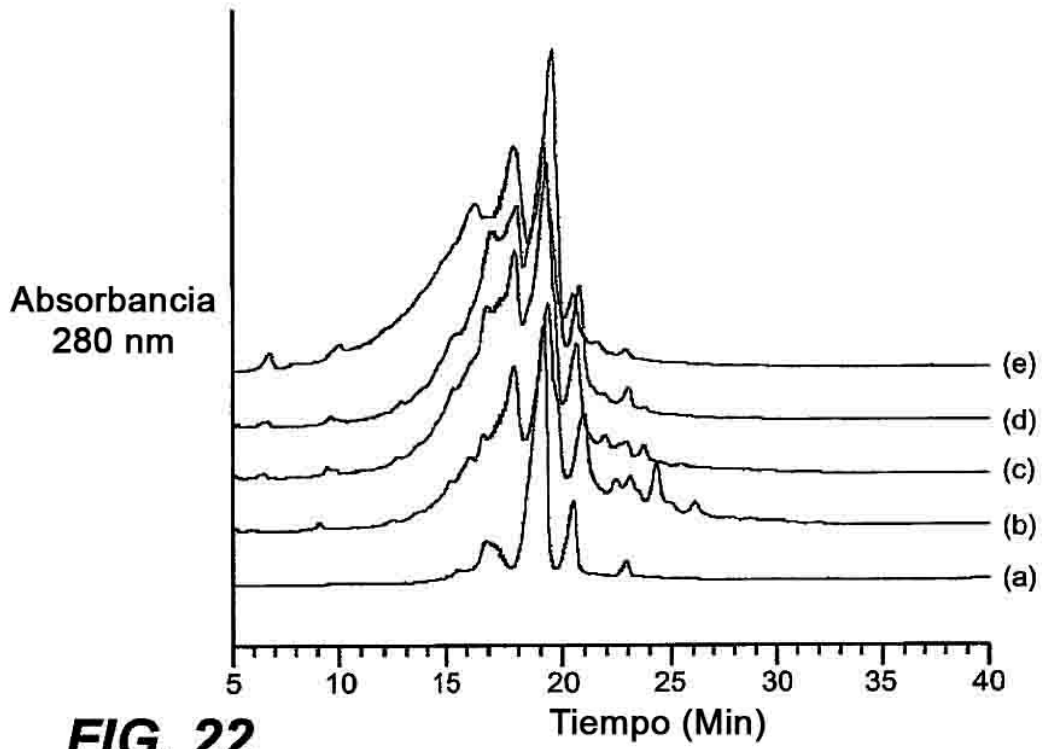


FIG. 21



1 TTTCTCACTGACTATAAAGAATAGAGAAGGAGGCTTCAGTGACCCGGCTGCCTGGCTGACTTACAGCAGTCAGACTCTGACAGGATC
1 ATGGCTATGATGGAGGTCCAGGGGGACCCAGCCCTGGGACACAGACCTGGCTGTGATCGTGTGATCTTCACAGTGTCTCCTGCAGTCTCTCTGT
1 MetAlaMetMetGluValGlnGlyGlyProSerLeuGlyGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuLeuGlnSerLeuCys
181 GTGGCTGTAACTTACGCTACTTTACCAACGAGCTGAAGCAGATGCAGGACAAGTACTCCAAAAGTGGCATTGGCTTGTCTTAAAGAA
31 ValAlaValThrTyrValTyrPheThrAsnGluLeuLysGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGlyIleAlaCysPheLeuLysGlu
271 GATGACAGTTATTGGACCCCAATGACGAAGAGAGATGAACAGCCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTCAGTCTCGTTAGAAAG
61 AspAspSerTyrTrpAspProAsnAspGluGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys
361 ATGATTTTGAGAACCTCTGAGGAAACCATTTCTACAGTTCAGAAAAGCAACAAAATAATTTCTCCCTAGTGAGAGAAAGAGGTCCTCCNCAG
91 MetIleLeuArgThrSerGluGluThrIleSerThrValGlnGluLysGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln
451 AGAGTAGCAGCTCACATAACTGGGACCAGAGGAAGAACACATTGTCTCTCCAAACTCCAAGAATGAAAAGGCTCTGGGCCGCAAA
121 ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsnGluLysAlaLeuGlyArgLys
541 ATAAACTCCTGGGAATCATCAAGGAGTGGGCATTCATCTCAGCAACTTGCACTTGAGGAATGGTGAACCTGGTCATCCATGAAAAAGGG
151 IleAsnSerTrpGluSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGluLysGly
631 TTTTACTACATCTATTCCCAAACATACTTTCGATTTTCAGGAGGAATAAAGAAAACACAAAAGAACGACAAAATGGTCCAATATATT
181 PheTyrTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGluIleLysGluAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrIle
721 TACAAATACACAAGTTATCCTGACCCCTATATTGTTGATGAAAAGTGTAGAAATAGTTGTTGGTCTAAAGATGCAGAATATGGACTCTAT
211 TyrLysTyrThrSerTyrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGluTyrGlyLeuTyr
811 TCCATCTATCAAGGGGAATATTGAGCTTAAGGAAAATGACAGAAATTTTGTCTGTAAACAAAATGAGCACTTGATAGACATGGACCAT
241 SerIleTyrGlnGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGluHisLeuIleAspMetAspHis
901 GAAGCCAGTTTTTTTCGGGGCCTTTTGTAGTTGGCTAACTGACCTGGAAAAGAAAAGCAATAACCTCAAAGTGACTATTTCAGTTTCAGGAT
271 GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGlyStp
991 GATACACTATGAGATGTTTCAAAAANTCTGACCAAAAACAACACAGAAA

FIG. 24

1 CCCACGGCT CGATAAATC AGCAGCGGC CGGAGAACC CGCAATCTCT CGCCACAAA AATACACCGA CGATGCCCGA TCCTACTTTAA GGGTGAAC
 GGGTCCGAG GCGTATTTAG TCGTCCGCG GCGTCTTEGG GCGTTAGAGA CCGGGTGT TTATGTGGCT GCTACGGGCT AGATGAAAT CCCGACTTTG
 101 CCACGGGCT GAGACTAT AAGAGGTTT CCTACCGCA TGGACAAC GGGACAGAC GCCCGGCG CTTGGGGGC CCGHAAAGG CAGGCCAG
 GGTGCCCGA CTCTCTGATA TTCTCCGCAAG GGATGGCGT ACCTTCTTC CCCTGTCTG CCGGGCCGG GAAGCCCCG GGCCTTTTC GTGCCGGTC
 1 M etGluGlnAr gGlyGlnAsn AlaProAla lAserGlyAl aArgLysArg HisGlyProGly
 201 GACCCAGGA GCGCGGGG GACAGGCTG GGTCCGGGT CCCAGAGACC CTTGTGCTG TTGTCTCTG TTGGTCTCAG CTGACTCTGC
 CTGGTCCCT CCGCGCCCT CCGTCCGAC CCGAGCCCA GGGTCTCG GAAACAGAG AACAGCGCG CCAGGACGAC AACAGAGTIC GACTCAGACG
 22 ProArgG lAlaArgGly AlaArgProG lYLeuArgVa lProLysThr LeuValLeuV alValAlaAl aValLeuLeu LeuValSerA laGluSerAla
 301 TCTGATCAC CAAACAAGACC TAGTCCCA GCAGAGAGC GCCCACAAC AAAAGAGTC CAGCCCTCA GAGGATTTGT GTCCACCTGG ACACATATC
 AGACTAGTGG GTGTCTCG ATCCAGGGGT CGTCTCTCG CCGGTCTG TTTTCTCCAG GTCGGGAGT TCCTCTAACA CAGTGGACC TGTGTFATAG
 55 LeuIleThr GlnGlnAspL euAlaProG l nGlnArgAla AlaProGlnG InLysArgSe rSerProSer GluGlyLeuC ysProProG l yHisIle
 401 TCAGAGAGC GTAGAGATTG CATCTCTGC AAATATGGAC AGGACTATAG CACTACTGG AATGACCTCC TTTTCTGCTT GCGTGCACC AGGTGTGATT
 AGTCTTCTG CATCTCTAC GTAGAGAGC TTTATACCTG TCCTGATATC GTAGTGACC TACTGGAGG AAAAGACGAA CCGCACGTTG TCCACACTAA
 88 SerGluaspG lYArgAspCy sIleSerCys LysTyrGlyG InAspTyrSe rThrHisTrp AsnAspLeuL euPheCysLe uArgCysThr ArgCysAspSer
 501 CAGGTGAAGT GGAGTAAAT CCCTGCACCA CGACCAGAAA CACAGTGTGT CAGTCCGAA GAGGCACCTT CCGGGAAGAA GATTCCTCTG AGATGTGCCG
 GTCCACTTCA CCTCGATTCA GGGAGTGGT GCTGTCTTT GTGTACACA GTCACGTTT TCCTGTGAA GCGCTTCTT CTAAGAGGAC TCTACACGGC
 122 GlyGluVa lGluLeuSer ProCysThrT hrThrArgAs nThrValCys GlnCysGluG luGlyThrPh eArgGluGlu AspSerProg luMelCysArg
 601 GAAGTCCCG ACAGGGTTC CCAGAGGAT GGTCAAGTC GGTGATTGTA CACCTGGAG TGACATGAA TGTGTCCACA AAGAATCAGG CATCATCATA
 CTTACGGCG TGTCCACAG GGTCTCCCA CCAGTCCAG CCACTAACAT GTGGGACCTC ACTGTAGCTT ACACAGGTGT TTCTTAGTCC GTAGTAGTAT
 155 LysCysArg ThrGlyCysP roArgGlyMe tValLysVal GlyAspCysT hrProTrpSe rAspIleGlu CysValHisL ysGluSerG l yIleIleIle
 701 GGAGTCACAG TTGCAGCCGT AGTCTTGATT GTGGCTGTGT TTGTTGCAA GTCTTACTG TGGAAAGAAG TCCTTCTTAA CCTGAAAGGC ATCTGCTCAG
 CCTCAGTTC AACGTCCGCA TCAGAACTAA CACCGACACA AACAAAGTT CAGAAATGAC ACCTTCTTTC AGGAAGGAAAT GGACTTTCCG TAGACGAGTC
 188 GlyValThrV alAlaAlaVa lValLeuIle ValAlaValP heValCysLy sSerLeuLeu TrpLysLysV alLeuProTy rLeuLysGly IleCysSerGly
 801 GTGGTGGTG GGACCTGAG CGTGTGGACA GAAGTCCACA ACAGCTGGG GCTGAGACA ATGTCTCAA TGAGATCTGT AGTATCTTGC AGCCACCCA
 CACCACACC CCTGGGACTC GCACACCTGT CTTGAGTGT TGCTGACCC CGACTCTGT TACAGGAGT ACTTAGCAC TCATAGAAG TCGGGTGGT
 222 GlyGlyG lYaspProGlu ArgValAspA rgsSerSerG l nArgProGly AlaGluaspA snValLeuAs nGluIleVal SerIleLeuG lnProThrGln

FIG. 25A

901 GGTCCCTGAG CAGGAAATGG AAGTCCAGGA GCCAGCAGAG CCAACAGGTG TCAACATGTT GTCCCCGGG GAGTCAGAGC ATCTGCTGGA ACCGGCAGAA
 CCAGGACTC GTCCCTTTACC TTCAGGTCCT CGGTGCTCTC GGTGTCCAC AGTTGTACAA CAGGGGCCC CTCAGTCTCG TAGAGGACCT TGGCCGCTTT
 255 ValProGlu GlnGluMetG luValGlnG1 uProAlaGlu ProThrGlyV alAsnMetLe uSerProGly GluSerGluH isLeuLeuG1 uProAlaGlu
 1001 GCTGAAGGT CTCAGAGGAG GAGGCTGCTG GTTCCAGCAA ATGAAGGTGA TCCCACTGAG ACTCTGAGAC AGTGCCTGGA TGACTTTGCA GACTTGTGTC
 CGACTTTCCA GAGTCTCCCTC CTCCGACGAC CAAGGTGCTT TACTTCCACT AGGTGACTC TGAGACTCTG TCACGAAAGT ACTGAAAAGT CTGAACCCAGG
 288 AlaGluArgS erGlnArgAr gArgLeuLeu ValProAlaA snGluGlyAs pProThrGlu ThrLeuArgG InCysPheAs pAspPheAla AspLeuValPro
 1101 CCTTTGACTC CTGGGAGCG CTATGAGGA AGTGGGCT CATGGACAAT GAGATAAAGG TGGCTAAAGC TGAGGCAGCG GGCCACAGGG ACACCTTGTA
 GGAACCTGAG GACCCCTGGC GAGTACTCCT TCAACCCGGA GTACTGTFTA CTCTATTTCC ACCGATTCG ACTCCGTCGC CCGGTGTCCC TGTGGAACAT
 322 PheAspSe rTrpGluPro, LeuMetArgL ysLeuGlyLe uMetAspAsn GluIleLysV alAlaLysAl aGluAlaAla GlyHisArgA spThrLeuTyr
 1201 CACGATGCTG ATAAAGTGG TCAACAAAAC CGGGGAGAT GCCTCTGTCC ACACCTGCT GCATGCCCTG GAGACGCTGG GAGAGAGACT TGCCAAAGCAG
 GTGCTACGAC TATTTACCC AGTTGTTTTG GCCCGCTTA CGGAGACAGG TGTGGGACGA CCTACGGAAC CTCTGCGACC CTCTCTCTGA ACGGTTCTCTC
 355 ThrMetLeu IleLysTrpV alAsnLysTh rGlyArgAsp AlaSerValH isThrLeuLe uAspAlaLeu GluThrLeuG LyGluArgLe uAlaLysGln
 1301 AAGATTGAGG ACCACTTGTG GAGCTCTGGA AAGTTCATGT ATCTAGAAGG TAATGCAGAC TCTGCTGCTG CCTAAGTGTG ATTCTCTTCA GGAAGTGAGA
 TTCTAACTCC TGGTGAACAA CTCGAGACCT TTCAAAGTACA TAGATCTTCC ATTACGCTCTG AGACGGAACA GGATTCACAC TAAGAGAAGT CCTTCACCTCT
 388 LysIleGluA spHisLeuLe uSerSerGly LysPheMetT yrLeuGluG1 yAsnAlaAsp SerAlaXaaS erOC*
 1401 CCTTCCCTGG TTTACCTTTT TTCTGGAAAA AGCCCCACTG GACTCCAGTC AGTAGGAAAG TGCCACAATT GTCACATGAC CGGTACTGGA AGAAACTCTC
 GGAAGGACC AAATGGAAAA AAGACCTTTT TCGGGTTGAC CTGAGGTCAG TCATCTTTC ACGGTGTTAA CAGTGTACTG GCCATGACCT TCTTTGAGAG
 1501 CCATCCAACA TCACCCAGTG GATGGAACAT CCTGTAACTT TTCACTGCAC TTGGCATTTAT TTTTATAAGC TGAATGTGAT AATAAGGACA CTATGGAAAT
 GGTAGGTTGT ACTGGGTCAC CTACCTTGTA GGACATTGAA AAGTGACCTG ACCCTAATA AAAATATTCC ACTTACACATA TTTATTTCTGT GATACCTTTTA
 1601 GTCITGGATCA TTCCGTTTTGT GCGTACTTTG AGATTTGGTT TGGGATGTC TTTGTTTTTC AGCCTTTTTT TATCCTAATG TAAATGCTTT ATTATTTTAT
 CAGACCTAGT AAGGCAACA CGCATGAAAC TCTAAACCAA ACCCTACAGT AACAAAAGTG TCGTAAAAA ATAGGATTTAC ATTTACGAAA TAAATAAATA
 1701 TTGGGCTACA TTGTAAGATC CATCTACAAA AAAAAAAAAG GCGGCCGCG ACTCTAGAGT CGACCTGCGAG AAGCTTGGCC GCCATGGCC
 AACCCGATGT AACATTTCTAG GTAGATGTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT CCGCCGCGC TGAGATCTCA GCTGGACGTC TTTCGAACCCG CGGTACCCG

FIG. 25B

ATG Met 1	GAA Glu	CAA Gln	CGG Arg	GGA Gly 5	CAG Gln	AAC Asn	GCC Ala	CCG Pro	GCC Ala 10	GCT Ala	TCG Ser	GGG Gly	GCC Ala	CGG Arg 15	AAA Lys	48
AGG Arg	CAC His	GGC Gly	CCA Pro 20	GGA Gly	CCC Pro	AGG Arg	GAG Glu	GCG Ala 25	CGG Arg	GGA Gly	GCC Ala	AGG Arg	CCT Pro 30	GGG Gly	CCC Pro	96
CGG Arg	GTC Val	CCC Pro 35	AAG Lys	ACC Thr	CTT Leu	GTG Val	CTC Leu	GTT Val 40	GTC Val	GCC Ala	GCG Ala	GTC Val 45	CTG Leu	CTG Leu	TTG Leu	144
GTC Val 50	TCA Ser	GCT Ala	GAG Glu	TCT Ser	GCT Ala	CTG Leu 55	ATC Ile	ACC Thr	CAA Gln	CAA Gln	GAC Asp 60	CTA Leu	GCT Ala	CCC Pro	CAG Gln	192
CAG Gln 65	AGA Arg	GCG Ala	GCC Ala	CCA Pro	CAA Gln 70	CAA Gln	AAG Lys	AGG Arg	TCC Ser	AGC Ser 75	CCC Pro	TCA Ser	GAG Glu	GGA Gly	TTG Leu 80	240
TGT Cys	CCA Pro	CCT Pro	GGA Gly	CAC His 85	CAT His	ATC Ile	TCA Ser	GAA Glu	GAC Asp 90	GGT Gly	AGA Arg	GAT Asp	TGC Cys	ATC Ile 95	TCC Ser	288
TGC Cys	AAA Lys	TAT Tyr	GGA Gly 100	CAG Gln	GAC Asp	TAT Tyr	AGC Ser	ACT Thr 105	CAC His	TGG Trp	AAT Asn	GAC Asp 110	CTC Leu	CTT Leu	TTC Phe	336
TGC Cys	TTG Leu	CGC Arg 115	TGC Cys	ACC Thr	AGG Arg	TGT Cys	GAT Asp 120	TCA Ser	GGT Gly	GAA Glu	GTG Val 125	GAG Glu	CTA Leu	AGT Ser	CCG Pro	384
TGC Cys 130	ACC Thr	ACG Thr	ACC Thr	AGA Arg	AAC Asn	ACA Thr 135	GTG Val	TGT Cys	CAG Gln	TGC Cys	GAA Glu 140	GAA Glu	GGC Gly	ACC Thr	TTC Phe	432
CGG Arg 145	GAA Glu	GAA Glu	GAT Asp	TCT Ser	CCT Pro 150	GAG Glu	ATG Met	TGC Cys	CGG Arg	AAG Lys 155	TGC Cys	CGC Arg	ACA Thr	GGG Gly	TGT Cys 160	480
CCC Pro	AGA Arg	GGG Gly	ATG Met	GTC Val 165	AAG Lys	GTC Val	GGT Gly	GAT Asp 170	TGT Cys	ACA Thr	CCC Pro	TGG Trp	AGT Ser	GAC Asp 175	ATC Ile	528
GAA Glu	TGT Cys	GTC Val	CAC His 180	AAA Lys	GAA Glu	TCA Ser	GGT Gly 185	ACA Thr	AAG Lys	CAC His	AGT Ser	GGG Gly	GAA Glu 190	GCC Ala	CCA Pro	576
GCT Ala	GTG Val	GAG Glu	GAG Glu	ACG Thr	GTG Val	ACC Thr	TCC Ser 200	AGC Ser	CCA Pro	GGG Gly	ACT Thr 205	CCT Pro	GCC Ala	TCT Ser	CCC Pro	624
TGT Cys 210	TCT Ser	CTC Leu	TCA Ser	GGC Gly	ATC Ile	ATC Ile	ATA Ile 215	GGA Gly	GTC Val	ACA Thr	GTT Val 220	GCA Ala	GCC Ala	GTA Val	GTC Val	672

FIG. 26A

TTG	ATT	GTG	GCT	GTG	TTT	GTT	TGC	AAG	TCT	TTA	CTG	TGG	AAG	AAA	GTC	720
Leu	Ile	Val	Ala	Val	Phe	Val	Cys	Lys	Ser	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Val	
225					230					235					240	
CTT	CCT	TAC	CTG	AAA	GGC	ATC	TGC	TCA	GGT	GGT	GGT	GGG	GAC	CCT	GAG	768
Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ile	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	Pro	Glu	
				245					250					255		
CGT	GTG	GAC	AGA	AGC	TCA	CAA	CGA	CCT	GGG	GCT	GAG	GAC	AAT	GTC	CTC	816
Arg	Val	Asp	Arg	Ser	Ser	Gln	Arg	Pro	Gly	Ala	Glu	Asp	Asn	Val	Leu	
			260					265					270			
AAT	GAG	ATC	GTG	AGT	ATC	TTG	CAG	CCC	ACC	CAG	GTC	CCT	GAG	CAG	GAA	864
Asn	Glu	Ile	Val	Ser	Ile	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Val	Pro	Glu	Gln	Glu	
		275					280					285				
ATG	GAA	GTC	CAG	GAG	CCA	GCA	GAG	CCA	ACA	GGT	GTC	AAC	ATG	TTG	TCC	912
Met	Glu	Val	Gln	Glu	Pro	Ala	Glu	Pro	Thr	Gly	Val	Asn	Met	Leu	Ser	
	290					295					300					
CCC	GGG	GAG	TCA	GAG	CAT	CTG	CTG	GAA	CCG	GCA	GAA	GCT	GAA	AGG	TCT	960
Pro	Gly	Glu	Ser	Glu	His	Leu	Leu	Glu	Pro	Ala	Glu	Ala	Glu	Arg	Ser	
305					310					315					320	
CAG	AGG	AGG	AGG	CTG	CTG	GTT	CCA	GCA	AAT	GAA	GGT	GAT	CCC	ACT	GAG	1008
Gln	Arg	Arg	Arg	Leu	Leu	Val	Pro	Ala	Asn	Glu	Gly	Asp	Pro	Thr	Glu	
				325					330					335		
ACT	CTG	AGA	CAG	TGC	TTC	GAT	GAC	TTT	GCA	GAC	TTG	GTG	CCC	TTT	GAC	1056
Thr	Leu	Arg	Gln	Cys	Phe	Asp	Asp	Phe	Ala	Asp	Leu	Val	Pro	Phe	Asp	
			340					345					350			
TCC	TGG	GAG	CCG	CTC	ATG	AGG	AAG	TTG	GGC	CTC	ATG	GAC	AAT	GAG	ATA	1104
Ser	Trp	Glu	Pro	Leu	Met	Arg	Lys	Leu	Gly	Leu	Met	Asp	Asn	Glu	Ile	
		355					360					365				
AAG	GTG	GCT	AAA	GCT	GAG	GCA	GCG	GGC	CAC	AGG	GAC	ACC	TTG	TAC	ACG	1152
Lys	Val	Ala	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	His	Arg	Asp	Thr	Leu	Tyr	Thr	
	370					375					380					
ATG	CTG	ATA	AAG	TGG	GTC	AAC	AAA	ACC	GGG	CGA	GAT	GCC	TCT	GTC	CAC	1200
Met	Leu	Ile	Lys	Trp	Val	Asn	Lys	Thr	Gly	Arg	Asp	Ala	Ser	Val	His	
385					390					395				400		
ACC	CTG	CTG	GAT	GCC	TTG	GAG	ACG	CTG	GGA	GAG	AGA	CTT	GCC	AAG	CAG	1248
Thr	Leu	Leu	Asp	Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	Lys	Gln	
				405					410					415		
AAG	ATT	GAG	GAC	CAC	TTG	TTG	AGC	TCT	GGA	AAG	TTC	ATG	TAT	CTA	GAA	1296
Lys	Ile	Glu	Asp	His	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Phe	Met	Tyr	Leu	Glu	
			420					425					430			
GGT	AAT	GCA	GAC	TCT	GCC	ATG	TCC	TAA								1323
Gly	Asn	Ala	Asp	Ser	Ala	Met	Ser	*								
		435					440									

FIG. 26B

EVQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGINWQGGSTGY
ADSVKGRVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKILGAGRGWYFDYWGKGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

<451 restos; 0 paradas; peso molecular: 49167.50

FIG. 27

SELTQDPAVSVALGQTVRITCSGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGANNRPSGIPDRF
SGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSADSSGNHVVFVGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYALASSYLS
LTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

<213 restos; 0 paradas; peso molecular: 22400.70

FIG. 28

Alineamiento, cadenas pesadas de 16ES y Apomab 7.3

16E2	1	EVQLVQSGGGVERPGGSLRLS	CAASGFTFDDYGMSW
			*
Apomab7.3	1	EVQLVQSGGGVERPGGSLRLS	CAASGFTFDDYAMSW
16E2	37	VRQAPGKGLEWVSGINWNGG	STGYADSVKGRVTISRDN
			*
Apomab7.3	37	VRQAPGKGLEWVSGINWQGG	STGYADSVKGRVTISRDN
16E2	87	RAEDTAVYYCAKILGAGRGWY	FDLWGKGT
			*
Apomab7.3	87	RAEDTAVYYCAKILGAGRGWY	FDYWGKGT
16E2	137	KSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	VTVSWNSGALTS
Apomab7.3	137	KSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	VTVSWNSGALTS
16E2	187	SSVVTVPSSSLGTQTYICNV	NHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
Apomab7.3	187	SSVVTVPSSSLGTQTYICNV	NHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
16E2	237	ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI	SRTPEVTCVVVDVSHEDP
Apomab7.3	237	ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI	SRTPEVTCVVVDVSHEDP
16E2	287	EVHNAKTKPREEQYNSTYRV	VSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
Apomab7.3	287	EVHNAKTKPREEQYNSTYRV	VSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
16E2	337	EKTISKAKGQPREPQVYTLPP	SREEMTKNQVSLTCLVKGF
Apomab7.3	337	EKTISKAKGQPREPQVYTLPP	SREEMTKNQVSLTCLVKGF
16E2	387	SNGQPENNYKTTPPVLDSDGS	FFLYSKLTVDKSRWQQGNV
Apomab7.3	387	SNGQPENNYKTTPPVLDSDGS	FFLYSKLTVDKSRWQQGNV
16E2.huIgG1	437	HNHYTQKSLSLSPGK	
Apomab7.3	437	HNHYTQKSLSLSPGK	

FIG. 29

Alineamiento, cadenas ligeras de 16E2 y Apomab 7.3

16E2	1	SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD [*] SLRSYYASWYQKPGQAPVLVIYGKN [*]
Apomab7.3	1	SELTQDPAVSVALGQTVRITCSGDSLRSYYASWYQKPGQAPVLVIYGAN
16E2	51	NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRD [*] SSGNHVFFGG
Apomab7.3	51	NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSADSSGNHVFFGG
16E2	101	GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF [*] YPGAVTVAWK
Apomab7.3	101	GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF [*] YPGAVTVAWK
16E2	151	ADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEG
Apomab7.3	151	ADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEG
16E2	201	STVEKTVAPTECS
Apomab7.3	201	STVEKTVAPTECS

FIG. 30

Secuencia del dominio pesado variable de Apomab

CDR H1
EVQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMWVRQAPGKGLEWV

CDR H2
SGINWQGGSTGYADSVKGRVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

CDR H3
ILGAGRGWYFDYWGKGTTVTVSSASTKGP

FIG. 31A

Secuencia del dominio ligero variable de Apomab

CDR L1
SELTQDPAVSVALGQTVRITCSGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIY

CDR L2
GANNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSADSSGNHVV

CDRL3
FGGGTKLTVLG

FIG. 31B

Alineamiento de cadenas ligeras

	1	32
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQOKPGKAPKPLIYAP	

hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQOKPGKAPKPLIYAP	
	52	
hu2H7.v16	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG	

hu2H7.v511	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG	
	102	
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	

hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
	152	
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	

hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
	202	214
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC	

hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC	

FIG. 32

Alineamiento de cadenas pesadas

```

1
hu2H7.v16 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTF TSYN MHW
*****
hu2H7.v511 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTF TSYN MHW

37          52a          82abc
hu2H7.v16 VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTI SVDKSKNTLYLQMNSL
*****
hu2H7.v511 VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTI SVDKSKNTLYLQMNSL

83          100abcde          113
hu2H7.v16 RAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLVTVSS
*****
hu2H7.v511 RAEDTAVYYCARVVYYSRYWFYFDVWGQGLVTVSS

118
hu2H7.v16 ASTKGPSVFPLAPS
*****
hu2H7.v511 ASTKGPSVFPLAPS

132
hu2H7.v16 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
*****
hu2H7.v511 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

182
hu2H7.v16 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPA
*****
hu2H7.v511 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPA

232
hu2H7.v16 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
*****
hu2H7.v511 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

282
hu2H7.v16 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
*****
hu2H7.v511 VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAP

332
hu2H7.v16 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
* *****
hu2H7.v511 IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW

382
hu2H7.v16 ESNQGPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEA
*****
hu2H7.v511 ESNQGPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEA

432          447
hu2H7.v16 LHNHYTQKSLSLSPGK
*****
hu2H7.v511 LHNHYTQKSLSLSPGK

```

FIG. 33