

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 428**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/32** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2003 E 03721610 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1501856**

54 Título: **Variantes de anticuerpos anti-HER2**

30 Prioridad:

**10.04.2002 US 371609 P**

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

**19.04.2013**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)  
1 DNA WAY  
SOUTH SAN FRANCISCO CALIFORNIA 94080-  
4990, US**

72 Inventor/es:

**LOWMAN, HENRY, B.;  
GERSTNER, RESI, B. y  
CARTER, PAUL, J.**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 401 428 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

Variantes de anticuerpos anti-HER2.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

5 **[0001]** La presente invención se refiere a variantes de anticuerpos novedosas, particularmente a variantes de anticuerpos anti-HER2.

Descripción de la técnica relacionada

**[0002]** Miembros de la familia ErbB de tirosina cinasas receptoras son mediadores importantes de crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia de receptores incluye cuatro miembros distintos, que  
10 incluyen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o ErbB1), HER2 (ErbB2 o p 185<sup>neu</sup>), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).

**[0003]** p185<sup>neu</sup> se identificó originalmente como el producto del gen transformante de neuroblastomas de ratas químicamente tratadas. La forma activada del proto-oncogén *neu* resulta de una mutación puntual (valina a ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de *neu* se  
15 observa en cánceres de mama y ovario y establece una correlación con un mal pronóstico (Slamon y col., *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon y col., *Science* 244(4905):707-12 (1989); y patente de EE.UU. nº 4.968.603). Hasta la fecha no se ha informado de mutación puntual análoga a la de en el proto-oncogén *neu* para tumores humanos. La expresión en exceso de ErbB2 (frecuentemente, pero no uniformemente debida a amplificación génica) también se  
20 ha observado en otros carcinomas que incluyen carcinomas del estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. Véanse, entre otros, King y col., *Science*, 229:974 (1985); Yokota y col., *Lancet*, 1:765-767 (1986); Fukushigi y col., *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Geurin y col., *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen y col., *Oncogene*, 4:81-88 (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); Zhau y col., *Mol. Carcinog.*, 3:354-357 (1990); Aasland y col. *Br. J.*  
25 *Cancer*, 57:358-363 (1988); Williams y col. *Pathobiology*, 59:46-52 (1991); y McCann y col., *Cancer*, 65:88-92 (1990). ErbB2 puede expresarse en exceso en 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)).

**[0004]** Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata y ErbB2  
30 humano. Drebin y colaboradores ha producido anticuerpos contra el producto génico *neu* de rata, p185<sup>neu</sup>. Véase, por ejemplo, Drebin y col., *Cell*, 41:695-706 (1985); Myers y col., *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); y el documento WO94/22478. Drebin y col. *Oncogene* 2:273-277 (1988) informan que mezclas de anticuerpos reactivas con dos regiones distintas de p185<sup>neu</sup> producen efectos antitumorales sinérgicos sobre células NIH-3T3 transformadas con *neu* implantadas en ratones sin pelo. Véase también la patente de EE.UU. 5.824.311 concedida el 20 de octubre de  
35 1998.

**[0005]** Otros anticuerpos anti-ErbB2 con diversas propiedades se han descrito 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); documento  
40 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).

**[0006]** Hudziak y col., *Mol Cell Biol* 9(3):1165-72 (1989) describen la generación de un panel de anticuerpos  
45 anti-ErbB2 que se caracterizaron usando la línea celular de tumor de mama humano SK-BR-3. La proliferación celular relativa de las células SK-BR-3 tras la exposición a los anticuerpos se determinó por tinción con cristal violeta de las monocapas después de 72 horas. Usando este ensayo, la inhibición máxima se obtuvo con el anticuerpo llamado 4D5 que inhibió el 56% la proliferación celular. Otros anticuerpos en el panel redujeron la proliferación celular a un menor grado en este ensayo. Se encontró adicionalmente que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba líneas  
50 celulares de tumor de mama que expresaban en exceso ErbB2 a los efectos citotóxicos de TNF- $\alpha$ . Véase también la patente de EE.UU. nº 5.677.171 concedida el 14 de octubre de 1997. Los anticuerpos anti-ErbB2 tratados en Hudziak y col., A., *Mol Cell Biol* 9(3):1165-72 (1989) se caracterizan adicionalmente en Fendly y col., *Cancer Res* 50(5):1550-8 (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).

- 5 **[0007]** El anticuerpo anti-HER2 monoclonal murino inhibe el crecimiento de líneas celulares de cáncer que expresan en exceso HER2 al nivel 2+ y 3+, pero no tiene actividad sobre células que expresan menores niveles de HER2 (Lewis y col., Cancer Immunol. Immunother. [1993]). Basándose en esta observación, el anticuerpo 4D5 se humanizó (Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-4289 [1992]). La versión humanizada designada HERCEPTIN® (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, patente de EE.UU. n° 5.821.337) se probó en pacientes con cáncer de  
 10 mama cuyos tumores expresaban en exceso HER2, pero que habían progresado después de quimioterapia convencional (Cobleigh y col., J. Clin. Oncol. 17: 2639-2648 [1999]). La mayoría de los pacientes en este ensayo expresaron HER2 al nivel 3+, aunque una fracción fue tumores 2+. Sorprendentemente, HERCEPTIN® indujo respuestas clínicas en el 15% de los pacientes (respuestas completas en el 4% de los pacientes, y respuestas parciales en el 11%) y la mediana de la duración de aquellas respuestas fue 9,1 meses. HERCEPTIN® recibió  
 15 autorización para la comercialización de la Agencia estadounidense del medicamento el 25 de septiembre de 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores expresan en exceso la proteína ErbB2.

#### Resumen de la invención

- [0008]** La presente invención se basa en el hallazgo de que aminoácidos particulares del anticuerpo anti-  
 20 HER2 humanizado hu4D5-8, determinados por barrido con alanina que son necesarios para la unión a antígeno, y otros aminoácidos encontrados por barrido con alanina que son relativamente poco importantes para la unión a antígeno, pueden sustituirse para producir variantes que tienen alta afinidad por HER2. Posiciones preferidas y otras posiciones para posibles mutaciones se muestran en la Figura 2. Por tanto, aunque ciertas variantes se tratan en detalle en el presente documento, también se contemplan otras variantes con sustituciones en una o más de las  
 25 posiciones indicadas en la Figura 2.

**[0009]** La presente invención es un anticuerpo como se define en las reivindicaciones.

**[0010]** El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado (incluyendo quimérico) o humano, que incluye fragmentos de anticuerpos tales como, por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>.

- [0011]** El anticuerpo puede comprender, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos F100(V<sub>H</sub>)P y  
 30 Y102(V<sub>H</sub>)K o F100(V<sub>H</sub>)P y Y102(V<sub>H</sub>)L.

**[0012]** En una realización específica, D98(V<sub>H</sub>) está sustituido con W.

**[0013]** En todavía otra realización, las regiones hipervariables de SEQ ID NOs: 1 y 2 comprenden las siguientes sustituciones: Y49(V<sub>L</sub>)D, F53(V<sub>L</sub>)W, Y55(V<sub>L</sub>)W, F100(V<sub>H</sub>)P y Y102(V<sub>H</sub>)L. En una realización particular, las regiones hipervariables de SEQ ID NO 2 pueden comprender además la sustitución D98(V<sub>H</sub>)W.

- 35 **[0014]** En una realización adicional, la afinidad de unión del anticuerpo por el dominio extracelular de HER2 es al menos aproximadamente tres veces mejor que la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal humanizado 4D5-8 por el dominio extracelular de HER2.

**[0015]** De nuevo, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, humanizado (incluyendo quimérico) o humano, que incluye fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>.

- 40 **[0016]** En todavía otra realización, el anticuerpo anti-HER2 humanizado 4D5-8 comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: Y49(V<sub>L</sub>)D, F53(V<sub>L</sub>)W, Y55(V<sub>L</sub>)W, F100(V<sub>H</sub>)P y Y102(V<sub>H</sub>)K.

**[0017]** En una realización diferente, el anticuerpo anti-HER2 humanizado 4D5-8 comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: Y49(V<sub>L</sub>)D, F53(V<sub>L</sub>)W, Y55(V<sub>L</sub>)W, F100(V<sub>H</sub>)P y Y102(V<sub>H</sub>)L.

- 45 **[0018]** También se describe un artículo de fabricación que comprende un recipiente, una composición contenida en su interior y un prospecto o etiqueta que indica que la composición puede usarse para tratar cáncer caracterizado por la expresión en exceso de HER2, en el que la composición comprende el anticuerpo de la invención. El cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de mama.

- [0019]** En otro aspecto más, la invención se refiere a una variante de anticuerpo de un anticuerpo parental que se une a HER2, que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 98 de un dominio variable de la  
 50 cadena pesada del mismo, y en el que la afinidad de unión de la variante de anticuerpo por HER2 es mejor que la afinidad de unión del anticuerpo parental por HER2. En una realización específica, el aminoácido en la posición 98

está sustituido con W. El anticuerpo parental puede ser, sin limitación, un anticuerpo humanizado.

**[0020]** En el presente documento también se describe un procedimiento para aislar variantes de alta afinidad de un anticuerpo anti-HER2 humanizado.

#### Breve descripción de los dibujos

#### 5 [0021]

La Figura 1A muestra los residuos de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) de huMab4D5-8 (SEQ ID NO. 1). La Figura 1B muestra los residuos de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) de huMab4D5-8 (SEQ ID NO. 2). Ambas Figuras 1A y 1B usan el esquema de numeración generalmente aceptado de Kabat, E. A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)). En las Figuras 1A y 1B, los residuos de la región hipervariable se identifican subrayados. Como se trata más abajo en más detalle, las regiones hipervariables se determinaron según tanto una definición de secuencias convencional (Kabat, E. A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)) como una definición estructural (Chothia, C. & Lesk, A. M., J Mol Biol 196(4):901-17 (1987)). En la Figura 1A, estas regiones se designan  $V_L$ -región hipervariable 1 (que comprende la secuencia de aminoácidos RASQDVNTAVA (SEQ ID NO: 19)),  $V_L$ -región hipervariable 2 (que comprende la secuencia de aminoácidos SASFLYS (SEQ ID NO: 20)) y  $V_L$ -región hipervariable 3 (que comprende la secuencia de aminoácidos QQHYTTPT (SEQ ID NO: 21)). En la Figura 1B, las regiones hipervariables se designan  $V_H$ -región hipervariable 1 (que comprende la secuencia de aminoácidos GFNIKDTYIH (SEQ ID NO: 22)),  $V_H$ -región hipervariable 2 (que comprende la secuencia de aminoácidos RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 23)) y  $V_H$ -región hipervariable 3 (que comprende la secuencia de aminoácidos WGGDGFYAMDY (SEQ ID NO: 24)).

La Figura 2A muestra las posiciones de residuos mutadas en bibliotecas expresadas en fago. Diecinueve residuos sobre la superficie del Fab hu4D5-8 se aleatorizaron completamente usando degeneración de codones NNS. Los residuos aleatorizados (numeración de Kabat; Johnson, G. & Wu, T. T., Nucleic Acids Res 29(1):205-6 (2001)) se agruparon por su localización sobre la superficie de la estructura del anticuerpo en cinco bibliotecas, mostradas en la Figura 2B. Algunos residuos se incluyeron en más de una biblioteca para probar efectos dependientes del contexto.

La Figura 3 muestra sustituciones de aminoácidos en clones de fago de Fab. Para cada posición se muestran la biblioteca fuente, residuo natural y el residuo más comúnmente observado ( $\phi$ ) después de 4 rondas de selección. La frecuencia observada (%) de cada aminoácido en cada posición (numeración de Kabat; Johnson, G. & Wu, T. T., Nucleic Acids Res 29(1):205-6 (2001)) se calculó basándose en el número de clones secuenciados únicos ( $N_U$ ; es decir, quitando clones hermanos) y se normalizó para codones degenerados, sesgo de codones y el número total de secuencias únicas (quitadas los hermanos). Las frecuencias naturales y las más comunes se muestran en negrita y subrayadas, respectivamente.  $N_T$ , número total de clones secuenciados (incluyendo hermanos) para esta posición.

La Figura 4 muestra la cinética de unión a antígeno de mutantes de Fab a 37°C. Los valores para  $k_{as}$  y  $k_{dis}$  se midieron por resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un BIAcore 2000 o BIAcore 3000. Estos representan una media de 4 mediciones a cuatro densidades diferentes de HER2-ECD que oscilan de 86 a 380 UR. § indica datos para un mutante, Y92( $V_L$ )W, que mostró escasa expresión y unión a HER2, sugiriendo que este mutante estaba desplegado. Mutantes múltiples son M.3 (N30( $V_L$ )S + H91( $V_L$ )F + Y92( $V_L$ )W) y M.7 (N30( $V_L$ )S + H91( $V_L$ )F + Y92( $V_L$ )W + T94( $V_L$ )S + D98( $V_H$ )W + Y100a( $V_H$ )F + Y102( $V_H$ )V).

La Figura 5 muestra la variabilidad de residuos seleccionados en hu4D5-8. El parámetro de variabilidad de Wu-Kabat ( $V_S$ ) para los resultados seleccionados de fagos (sólido) frente a la variabilidad natural de cadenas ligeras kappa humanas y cadenas pesadas humanas (gris). La variabilidad se calcula del siguiente modo:  $V_S = n_{aa} / (N_{m\acute{a}x} / N_{total})$  en la que  $n_{aa}$  = el número de aminoácidos diferentes (es decir, de los 20 posibles) en una posición dada,  $N_{m\acute{a}x}$  = apariciones del aminoácido más común en esa posición y  $N_{total}$  = número total de aminoácidos en esa la posición (Wu, T. T. & Kabat, E. A., J Exp Med 132(2), 211-50 (1970)).

La Figura 6 muestra las afinidades de unión de variantes de Fab a HER2-ECD. Los mutantes se comparan con naturales a cada temperatura indicada. Durante este intervalo de temperatura WT se vuelve ligeramente más débil ( $\Delta\Delta G = 0,20$ ) a mayores temperaturas. Las diferencias en las energías de unión ( $\Delta\Delta G$ ) en comparación con hu4D5-8 se calcularon para cada mutante usando valores de  $K_D$  como se muestra en la Figura 4: ( $\Delta\Delta G = \Delta G(WT) - \Delta G(mutante) = -RT \ln (K_D^{(mutante)} / K_D^{(natural)})$ ). El orden de mutantes representados es el mismo para cada panel de temperatura: (1) Y100a( $V_H$ )F; (2) T94( $V_L$ )S; (3) Y102( $V_H$ )V; (4) N30( $V_L$ )S; (5) H91( $V_L$ )F; (6) N30( $V_L$ )S + H91( $V_L$ )F + Y92( $V_L$ )W; (7) los mutantes múltiples N30( $V_L$ )S + H91( $V_L$ )F + Y92( $V_L$ )W + T94( $V_L$ )S + D98( $V_H$ )W + Y100a( $V_H$ )F + Y102( $V_H$ )V; y (8) D98( $V_H$ )W.

La Figura 7 ilustra una comparación de variabilidad de secuencias (A) y resultados de barridos con Ala (B) sobre la estructura de hu4D5-8. Los residuos seleccionados de bibliotecas de fagos (A) se clasifican en 3 categorías: clase 1,

baja variabilidad (residuos N30', G99', Y100a, W95, R50', Y33, R58' y Y56), clase 2, variabilidad moderada (residuos Y92, H91', T94', F53', Y49, Y55 y F100') y clase 3, alta variabilidad (residuos Y102 y D98'). (B) Resultados de barridos con Ala (Kelley, R. F. & O'Connell, M. P., *Biochemistry* 32(27):6828-35 (1993)) que muestran residuos con efectos sobre  $K_D$  de 50 veces a 5000 veces (residuos H91', Y100a, W95 y R50'), 1,5 a 2 veces (residuos Y92, N30', F53', Y49, F100' y D98') y <1,5 veces (incluyendo pequeñas mejoras en  $K_D$ ) (residuos D28', R66', T31', S50', S52', Y55, T93', T94', Y33, T32', Y56, Y52, D31', N54', T53' y K30').

#### Descripción detallada de la realización preferida

**[0022]** La presente invención se basa en la identificación de variantes de un anticuerpo anti-HER2 humanizado, hu4D5-8, que tiene afinidad de unión por HER2 igual a o mayor que el anticuerpo parental. Estas variantes se identificaron de un conjunto de bibliotecas de Fab en las que diecinueve posiciones en los dominios variables ligeros y/o pesados se sustituyeron con los 20 aminoácidos. Las posiciones se seleccionaron para sustituciones basadas en parte en la mutagénesis por barrido con alanina de las regiones variables de hu4D5-8. La variabilidad de secuencias dentro del sitio de unión a HER2 de alta afinidad del anticuerpo hu4D5-8 se probó construyendo bibliotecas de fagos de Fab monovalentemente expresadas, seleccionando clones que se unen a HER2 y secuenciación de una gran muestra (50-70 clones) de cada conjunto de bibliotecas en un punto en el procedimiento de selección en el que se observó un alto nivel de diversidad global (hermanos mínimos, es decir, aparición de clones idénticos). También se probaron las afinidades de unión de fragmentos Fab solubles. Se encontró que un único mutante, D98(V<sub>H</sub>)W, tenía una mejora de 3 veces en la afinidad de unión con respecto al Fab hu4D5-8 natural.

**[0023]** Por consiguiente, la presente invención se refiere a variantes de anticuerpos, particularmente a variantes de anticuerpos anti-HER2, como se define en las reivindicaciones.

#### 1. Definiciones

**[0024]** A menos que se defina de otro modo, términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Singleton y col., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2<sup>a</sup> ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994). Un experto en la materia reconocerá muchos procedimientos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento que podrían usarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no está limitada de ninguna forma a los procedimientos y materiales descritos. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen más adelante. En toda la divulgación, los términos "ErbB2", "receptor de ErbB2", "c-Erb-B2" y "HER2" se usan indistintamente y, a menos que se indique lo contrario, se refieren a un polipéptido humano de ErbB2 de secuencia nativa, o un derivado funcional del mismo. "her2", "erbB2" y "c-erb-B2" se refieren al gen humano correspondiente. Los términos "secuencia nativa" o "nativa" en este contexto se refieren a un polipéptido que tiene la secuencia de un polipéptido que se produce naturalmente, independientemente su modo de preparación. Tales polipéptidos de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos, o por cualquier combinación de estos procedimientos o procedimientos similares. Por consiguiente, polipéptidos HER2 "nativos" o de "secuencia nativa" pueden aislarse de la naturaleza, producirse por técnicas de tecnología de ADN recombinante, sintetizarse químicamente o producirse por cualquier combinación de estos procedimientos o procedimientos similares. Se desvela la secuencia de aminoácidos y secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido humano nativo, por ejemplo, en Semba y col., *PNAS (USA)* 82:6497-652 (1985) y Yamamoto y col., *Nature* 319:230-234 (1986) (número de acceso de GenBank X03363). ErbB2 comprende cuatro dominios (dominios 1-4). Los polipéptidos HER2 de otros animales no humanos, por ejemplo, especies de mamífero, también son muy conocidos en la técnica. "Derivados funcionales" incluye variantes de la secuencia de aminoácidos y derivados covalentes de los polipéptidos nativos en tanto que retengan una actividad biológica cualitativa del polipéptido nativo correspondiente. Las "variantes" de secuencias de aminoácidos generalmente se diferencian de una secuencia nativa en la sustitución, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos en cualquier parte dentro de una secuencia de aminoácidos nativa. Variantes de delección incluyen fragmentos de los polipéptidos nativos y variantes que tienen truncaciones en el extremo N y/o C.

**[0025]** "Heregulina" (HRG) cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que activa los complejos de proteína ErbB2-ErbB3 y ErbB2-ErbB4 (es decir, induce fosforilación de residuos de tirosina en el complejo tras la unión al mismo). Diversos polipéptidos de heregulina englobados por este término se desvelan, por ejemplo, en Holmes y col., *Science* 256:1205-1210 (1992); documento WO 92/20798; Wen y col., *Mol. Cell. Biol.* 14(3):1909-1919 (1994) y Marchionni y col., *Nature* 362:312-318 (1993). El término incluye fragmentos biológicamente activos y/o variantes de un polipéptido HRG que se produce naturalmente, tal como un fragmento de dominio similar a EGF del mismo (por ejemplo, HRG $\beta_{177-244}$ ).

**[0026]** El término "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y,

cuando corresponda, a ácido ribonucleico (ARN). El término también incluye, como equivalentes, análogos de cualquier ADN o ARN preparados a partir de análogos de nucleótidos, y cuando sea aplicable, polinucleótidos mono (sentido o antisentido) y bicatenarios. Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que generalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta en la forma o entorno en la que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico ya que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que generalmente expresan el anticuerpo cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

**[0027]** Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico con el que se ha ligado. El término "vector de expresión" incluye plásmidos, cósmidos o fagos que pueden sintetizar la proteína HER2 objeto codificada por el gen recombinante respectivo llevado por el vector. Vectores preferidos son aquellos que puede replicar y/o expresar autónomamente ácidos nucleicos con los que están ligados. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan indistintamente, ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector.

**[0028]** El término "transfección" se refiere a la introducción de un ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, en una célula receptora por transferencia de genes mediada por ácido nucleico. La "transformación", como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento en el que un genotipo de célula se cambia como resultado de la captación celular de ADN o ARN exógeno y, por ejemplo, la célula transformada expresa una forma recombinante de HER2.

**[0029]** El término "mamífero no humano" se refiere a todos los miembros de la clase de los mamíferos, excepto seres humanos. "Mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero que incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deportes o mascotas tales como ratón, rata, conejo, cerdo, oveja, cabra, ganado vacuno y primates superiores.

**[0030]** Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas tales designaciones incluyen progenie. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma sin consideración del número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en contenido de ADN debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. El término "progenie" se refiere a todos y cada uno de la descendencia de cada generación posterior a una célula o línea celular originariamente transformada. Está incluida progenie mutante que pueda tener la misma función o actividad biológica que la cribada en la célula originalmente transformada. Si están previstas designaciones distintas, será evidente del contexto.

**[0031]** El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos intactos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada.

**[0032]** El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminar por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse por el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o pueden prepararse por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando, por ejemplo, las técnicas descritas en Clackson y col., *Nature*; 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991). Los anticuerpos incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que

presenten la actividad biológica deseada (la 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 en el presente documento incluyen anticuerpos "privatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, etc.) y secuencias de la región constante humanas.

5 **[0033]** Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto que comprende preferentemente la región de unión a antígeno o región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; dímeros; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpos.

**[0034]** Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno, además de un dominio constante de la cadena ligera (C<sub>L</sub>) y dominios constantes de la cadena pesada, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de la secuencia nativa humana) o variante de la secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

**[0035]** Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen la mínima secuencia derivada de la inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad por anticuerpo deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para perfeccionar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc, Fv), correspondiéndose todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente 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).

30 **[0036]** Anticuerpos anti-ErbB2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) como se describen en la Tabla 3 de la patente de EE.UU. 5.821.337 expresamente incorporada en el presente documento por referencia; anticuerpos 520C9 humanizados (documento WO93/21319) y 2C4 humanizados como se describen en la solicitud pendiente de tramitación nº 09/811115, incorporada en el presente documento por referencia. En toda la divulgación, los términos 35 "huMAb4D5-8" y "hu4D5-8" se usan indistintamente.

**[0037]** El término "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman estructuralmente bucles definidos. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (es decir, los residuos 24-34, 50-56 y 89-97 en el dominio variable de la cadena ligera 40 y 31-35, 50-65 y 95-102 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 aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, los residuos 26-32, 50-52 y 91-96 en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32, 53-55 y 96-101 en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). En ambos casos, los residuos del dominio variable están numerados según Kabat y col., 45 arriba, como se trata más abajo en más detalle. Residuos de la "región estructural" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos en las regiones hipervariables como se han definido en el presente documento.

**[0038]** Un "anticuerpo parental" o anticuerpo "natural" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos que carece de una o más alteraciones de secuencias de aminoácidos en comparación con una variante 50 de anticuerpo como se ha desvelado en el presente documento. Por tanto, el anticuerpo parental generalmente tiene al menos una región hipervariable que se diferencia en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la región hipervariable correspondiente de una variante de anticuerpo como se ha desvelado en el presente documento. El polipéptido parental puede comprender un anticuerpo de secuencia nativa (es decir, uno que se produce naturalmente) (incluyendo una variante alélica que se produce naturalmente), o un anticuerpo con 55 modificaciones de la secuencia de aminoácidos pre-existentes (tal como inserciones, deleciones y/u otras alteraciones) de una secuencia que se produce naturalmente. Preferentemente, el anticuerpo parental es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. Por ejemplo, para los fines de los ejemplos desvelados más adelante,

el anticuerpo natural hu4D5-8 es huMAb4D5-8, como se describe en la patente de EE.UU. 5.821.337, sin ninguna sustitución de aminoácidos u otras modificaciones. En toda la divulgación, anticuerpo “natural,” “WT,” “wt” y “parental” se usan indistintamente.

**[0039]** Como se usa en el presente documento, “variante de anticuerpo” o “anticuerpo de variante” se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo parental. Preferentemente, la variante de anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada o un dominio variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en la naturaleza. Tales variantes tienen necesariamente menos del 100% de identidad de secuencias o similitud con el anticuerpo parental. En una realización preferida, la variante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 75% a menos del 100% de identidad de secuencias de aminoácidos o similitud con la secuencia de aminoácidos de tanto el dominio variable de la cadena pesada como ligera del anticuerpo parental, más preferentemente de aproximadamente el 80% a menos del 100%, más preferentemente de aproximadamente el 85% a menos del 100%, más preferentemente de aproximadamente el 90% a menos del 100%, y lo más preferentemente de aproximadamente el 95% a menos del 100%. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo residuo) con los residuos del anticuerpo parental, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias. Ninguno del extremo N, extremo C o extensiones internas, deleciones o inserciones en la secuencia de anticuerpos fuera del dominio variable debe interpretarse como que afecta la identidad de secuencias o similitud. La variante de anticuerpo es generalmente una que comprende una o más alteraciones de aminoácidos en o adyacentes a una o más regiones hipervariables del mismo.

**[0040]** Una “alteración de aminoácido” se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos predeterminada. Alteraciones a modo de ejemplo incluyen inserciones, sustituciones y deleciones. Una “sustitución de aminoácidos” se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada; con otro residuo de aminoácido diferente.

**[0041]** Un residuo de aminoácido de “reemplazo” se refiere a un residuo de aminoácido que reemplaza o sustituye otro residuo de aminoácido en una secuencia de aminoácidos. El residuo de sustitución puede ser un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o no naturalmente.

**[0042]** Una “inserción de aminoácido” se refiere a la introducción de uno o más residuos de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos predeterminada. La inserción de aminoácido puede comprender una “inserción de péptido”, en cuyo caso un péptido que comprende dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlace(s) peptídico(s) se introduce en la secuencia de aminoácidos predeterminada. Si la inserción de aminoácido implica inserción de un péptido, el péptido insertado puede generarse por mutagénesis al azar de forma que tenga una secuencia de aminoácidos que no existe en la naturaleza. Una alteración de aminoácido “adyacente a una región hipervariable” se refiere a la introducción o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N y/o extremo C de una región hipervariable, de forma que al menos uno del (de los) residuo(s) de aminoácido insertado(s) o de reemplazo formen un enlace peptídico con el residuo de aminoácido del extremo N o extremo C de la región hipervariable en cuestión.

**[0043]** Un “residuo de aminoácido natural” es uno codificado por el código genético, generalmente seleccionado del grupo que consiste en: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutámico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptófano (Trp); tirosina (Tyr); y valina (Val).

**[0044]** Un “residuo de aminoácido no natural” en el presente documento es un residuo de aminoácido distinto de aquellos residuos de aminoácidos que se producen naturalmente enumerados anteriormente, que pueden unirse covalentemente a residuo(s) de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptidos. Ejemplos de residuos de aminoácidos que no se producen naturalmente incluyen norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuos de aminoácido tales como aquellos descritos en Ellman y col. Meth. Enzym. 202:301-336 (1991). Para generar tales residuos de aminoácidos que no se producen naturalmente pueden usarse los procedimientos de Noren y col. Science 244:182 (1989) y Ellman y col., arriba. Brevemente, estos procedimientos implican activar químicamente un ARNt de supresor con un residuo de aminoácido no natural seguido de transcripción *in vitro* y traducción del ARN.

**[0045]** En toda esta divulgación se hace referencia al sistema de numeración de Kabat, E. A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991). En estos compendios, Kabat enumera muchas secuencias de aminoácidos para anticuerpos para cada subclase, y enumera el aminoácido que se produce más comúnmente para cada posición de residuo en esa subclase. Kabat

usa un procedimiento para asignar un número de residuo a cada aminoácido en una secuencia enumerada, y este procedimiento para asignar números de residuo se ha convertido en convencional en el campo. En esta descripción se sigue el esquema de numeración de Kabat. Para los fines de la presente invención, para asignar los números de residuos a una secuencia de aminoácidos del anticuerpo candidato que no está incluida en el compendio de Kabat se siguen las siguientes etapas. Generalmente, la secuencia candidata está alineada con cualquier secuencia de inmunoglobulina o cualquier secuencia consenso en Kabat. El alineamiento puede hacerse a mano o por ordenador usando programas informáticos comúnmente aceptados; un ejemplo de un programa tal es el programa Align 2. El alineamiento puede facilitarse usando algunos residuos de aminoácidos que son comunes para la mayoría de las secuencias de Fab. Por ejemplo, las cadenas ligeras y pesadas tienen cada una normalmente dos cisteínas que tienen los mismos números de residuo; en el dominio  $V_L$  las dos cisteínas están normalmente en los números de residuo 23 y 88, y en el dominio  $V_H$  los dos residuos de cisteína se numeran normalmente 22 y 92. Los residuos de la región estructural generalmente, pero no siempre, tienen aproximadamente el mismo número de residuos, sin embargo las CDR variarán en tamaño. Por ejemplo, en el caso de una CDR de una secuencia candidata que es más larga que la CDR en la secuencia en Kabat con la que está alineada, normalmente se añaden sufijos al número de residuo para indicar la inserción de residuos adicionales (véase, por ejemplo, residuos 100abc de la Figura 1B). Para secuencias candidatas que, por ejemplo, se alinean con una secuencia de Kabat para los residuos 34 y 36, pero no tienen residuo entre ellas para alinear con el residuo 35, el número 35 no se asigna simplemente a un residuo.

**[0046]** Como se describe en el presente documento, residuos de aminoácidos particulares pueden estar sustituidos con otros residuos. La designación de una variante de sustitución en el presente documento consiste en una letra seguida de un número seguido de una letra. La primera letra (a la izquierda) designa el aminoácido en el anticuerpo natural. El número se refiere a la posición de aminoácido en la que la sustitución de aminoácidos está haciéndose, y la segunda letra (derecha) designa el aminoácido que se usa para sustituir el aminoácido natural en esa posición. Además, puede insertarse una referencia a la cadena ligera del dominio variable del anticuerpo ( $V_L$ ) o dominio variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) tras el número para indicar la localización específica del residuo y/o sustitución. Por ejemplo, las variantes de hu4D5-8 enumeradas en la Figura 4 se designan con referencia a las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo hu4D5-8 natural (SEQ ID NOs: 1 y 2).

**[0047]** Como se usa en el presente documento, un anticuerpo con una "alta afinidad" es un anticuerpo que tiene una  $K_D$ , o constante de disociación, en el intervalo nanomolar (nM) o mejor. Una  $K_D$  en el "intervalo nanomolar o mejor" puede denotarse por  $X$  nM, en la  $X$  es un número inferior a aproximadamente 10.

**[0048]** Una molécula que "induce muerte celular" es una que hace que una célula viable se convierta en no viable. La célula es generalmente una que expresa el receptor de ErbB2, especialmente cuando la célula expresa en exceso el receptor de ErbB2. Preferentemente, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreático, próstata o de vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. La muerte celular *in vitro* puede determinarse en ausencia de complemento y células efectoras inmunitarias para distinguir muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por tanto, el ensayo para muerte celular puede realizarse usando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunitarias. Para determinar si la molécula puede inducir muerte celular, la integridad de la pérdida de membrana como se evalúa por captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (véase Moore y col. *Cytotechnology* 17:1-11 (1995)) o 7AAD puede evaluarse con respecto a células sin tratar. Anticuerpos inductores de muerte celular preferidos son aquellos que inducen captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474 (véase más adelante).

**[0049]** Una molécula que "induce apoptosis" es una que induce muerte celular programada como se ha determinado por unión de anexina V, fragmentación de ADN, encogimiento de células, dilatación de retículo endoplásmico, fragmentación de células y/o formación de vesículas de membrana (llamados cuerpos apoptóticos). La célula es normalmente una expresa en exceso el receptor de ErbB2. Preferentemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreático, próstata o de vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, Calu 3, célula MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. Están disponibles diversos procedimientos para evaluar los eventos celulares asociados a apoptosis. Por ejemplo, la translocalización de fosfatidilserina (PS) puede medirse por la unión a anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse por fragmentación de ADN; y la condensación nuclear/de cromatina junto con la fragmentación de ADN puede evaluarse por cualquier aumento en células hipodiploides. Preferentemente, la molécula que induce apoptosis es una que produce aproximadamente 2 a 50 veces, preferentemente aproximadamente 5 a 50 veces, y lo más preferentemente aproximadamente 10 a 50 veces, de inducción de unión a anexina con respecto a célula sin tratar en un ensayo de unión a anexina usando células BT474. Algunas veces, la molécula pro-apoptósica será una que bloquea adicionalmente la activación del ligando de ErbB de un receptor de ErbB. En otras situaciones, la molécula es una que no bloquea significativamente la activación del ligando de ErbB de un receptor de ErbB. Además, la molécula puede inducir apoptosis, sin inducir una

gran reducción en el porcentaje de células en fase S (por ejemplo, una que sólo induce aproximadamente 0-10% de reducción en el porcentaje de estas células con respecto al control).

**[0050]** Los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren tanto a tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas, en las que el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado tal como el desarrollo o diseminación del cáncer. Para los fines de la presente invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, disminución del grado de enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad y remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia con respecto a la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con la afección o trastorno, además de aquellos propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que la afección o trastorno va a prevenirse. El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de una molécula eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar a cierto grado y preferentemente parar) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar a cierto grado y preferentemente parar) metástasis tumorales; inhibir, a cierto grado, crecimiento tumoral; y/o aliviar a cierto grado uno o más de los síntomas asociados al cáncer. Hasta el punto de que la molécula pueda prevenir el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para terapia contra el cáncer, la eficacia puede, por ejemplo, medirse el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR).

**[0051]** “Tumor”, como se usa en el presente documento, se refiere a todo el crecimiento y proliferación celular neoplásico, tanto maligno como benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.

**[0052]** Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular sin regular. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, además de cáncer de cabeza y cuello.

**[0053]** Un cáncer “que expresa ErbB” o cáncer que comprende “células que expresan ErbB” es un cáncer que comprende células que tienen proteína ErbB presente en su superficie celular. Un cáncer “que expresa ErbB” o cáncer que comprende “células que expresan ErbB” es uno que produce niveles suficientes de ErbB2 en la superficie de células del mismo, de forma que un anticuerpo anti-ErbB2 puede unirse al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer.

**[0054]** Un cáncer “caracterizado por activación excesiva” de un receptor de ErbB es uno en el que el grado de activación del receptor de ErbB en células cancerosas supera significativamente el nivel de activación de ese receptor en células no cancerosas del mismo tipo de tejido. Tal activación excesiva puede resultar de expresión en exceso del receptor de ErbB y/o superior a niveles normales de un ligando de ErbB disponible para activar el receptor de ErbB en las células cancerosas. Tal activación excesiva puede producir y/o producirse por el estado maligno de una célula cancerosa.

**[0055]** Un cáncer que “expresa en exceso” un receptor de ErbB es uno que tiene niveles significativamente mayores de un receptor de ErbB, tal como HER2, en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Tal expresión en exceso puede producirse por amplificación génica o por aumento de la transcripción o traducción. La expresión en exceso del receptor de ErbB puede determinarse en un ensayo diagnóstico o de pronóstico evaluando el aumento de niveles de la proteína ErbB presente sobre la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). Alternativamente, o adicionalmente, pueden medirse niveles de ácido nucleico que codifican ErbB en la célula, por ejemplo, mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia Southern o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tales como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También puede estudiarse la expresión en exceso de receptores de ErbB midiendo antígeno perdido (por ejemplo, dominio extracelular de ErbB) en un fluido biológico tal como suero (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.933.294 concedida el 12 de junio de 1990; documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991; patente de EE.UU. 5.401.638 concedida el 28 de marzo de 1995; y Sias y col. J. Immunol. Methods 132:

73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, diversos ensayos *in vivo* están disponibles para el médico habitual. Por ejemplo, pueden exponerse células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con una marca detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y la unión del anticuerpo a células en el paciente puede evaluarse, por ejemplo, por barrido externo para radioactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

**[0056]** Los tumores que expresan en exceso HER2 pueden clasificarse por puntuaciones inmunohistoquímicas correspondientes al número de copias de moléculas de HER2 expresadas por célula, y pueden determinarse bioquímicamente: 0 = 0-10.000 copias/célula, 1+ = al menos aproximadamente 200.000 copias/célula, 2+ = al menos aproximadamente 500.000 copias/célula, 3+ = al menos aproximadamente 2.000.000 copias/célula.

10 La expresión en exceso de HER2 al nivel 3+, que conduce a activación independiente de ligando de la tirosina cinasa (Hudziak y col., A., *Mol Cell Biol* 9(3):1165-72 (1989)), se produce aproximadamente en el 30% de cánceres de mama, y en estos pacientes, la supervivencia sin recaída y la supervivencia global son reducidas (Slamon y col., *Science* 244(4905):707-12 (1989); Slamon y col., *Science* 235: 177-182 (1987)).

**[0057]** En cambio, un cáncer que “no se caracteriza por expresión en exceso del receptor de ErbB2” es uno que, en un ensayo de diagnóstico, no expresa niveles superiores a normales del receptor de ErbB2 en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido.

15

**[0058]** El término “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal que incluyen fragmentos y/o variantes de las mismas.

20

**[0059]** Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquilsulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reparadores de ácido fólico tales como ácido frofínico; aceglatona; glucósido

25

30

35

40

45

50

55

aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxourea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofílico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK<sup>®</sup>; razoxana; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazonico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE<sup>®</sup>, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. En esta definición también están incluidos agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas sobre tumores tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

**[0060]** Un “liposoma” es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para la administración de un fármaco (tal como los anticuerpos anti-ErbB2 desvelados en el

presente documento y, opcionalmente, un agente quimioterápico) a un mamífero. Los componentes del liposoma está comúnmente dispuestos en una formación de bicapa similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas.

**[0061]** Una “molécula pequeña” se define en el presente documento por tener un peso molecular inferior a 5 aproximadamente 500 Dalton.

## 2. Descripción detallada

**[0062]** La presente invención se refiere a variantes de anticuerpos, preferentemente variantes de anticuerpos anti-HER2. Los anticuerpos de variante pueden tomar varias formas diferentes. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser, sin limitación, anticuerpos intactos tales como anticuerpos IgG1, fragmentos de anticuerpos tales como Fab, 10 anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos.

**[0063]** Las variantes de anticuerpos comprenden preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos en el dominio variable de la cadena pesada y/o el dominio variable de la cadena ligera. Más preferentemente, las variantes de anticuerpos comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en las regiones hipervariables del dominio variable de la cadena pesada y/o el dominio variable de la cadena ligera.

15 **[0064]** Mientras que la presente invención contempla sustituciones de un único aminoácido según los criterios en el presente documento, dos o más sustituciones también pueden combinarse, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente diez o aproximadamente veinte sustituciones por dominio variable (es decir, hasta aproximadamente veinte o aproximadamente cuarenta, respectivamente, sustituciones de aminoácidos para ambos dominios variables). Las alteraciones descritas en el presente documento pueden combinarse con otras alteraciones 20 de secuencias de aminoácidos en las regiones hipervariables o alteraciones de secuencias de aminoácidos en otras regiones del anticuerpo.

**[0065]** Anticuerpos intactos que comprenden los dominios de la cadena pesada y/o ligera modificados descritos en el presente documento pueden prepararse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, anticuerpos de variante recombinantes pueden producirse en células huésped tales como células de *E. coli*, 25 células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de anticuerpo.

**[0066]** Alternativamente, anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas, por ejemplo, en McCafferty y col., Nature, 348:552-554 (1990).

## 30 Anticuerpos humanizados

**[0067]** Se conocen procedimientos para producir anticuerpos humanizados, particularmente anticuerpos anti-HER2 humanizados. Por ejemplo, la producción de un anticuerpo anti-HER2 humanizado conocido como hu4D5-8 se describe en los ejemplos más adelante y en la patente de EE.UU. 5.821.337, que se incorpora expresamente en el presente documento por referencia.

35 **[0068]** Este anticuerpo se derivó de un anticuerpo monoclonal murino, 4D5 (Fendly y col., Cancer Res 50(5):1550-8 (1990)), producido contra el producto génico de *erbB2* conocido como p185<sup>HER2</sup> o HER2 (Slamon y col., Science 244(4905):707-12 (1989)). El anticuerpo monoclonal murino 4D5 y sus usos se describen en la solicitud PCT WO 89106692 publicada el 27 de julio de 1989. El anticuerpo 4D5 murino se depositó en la ATCC y se designó ATCC CRL 10463.

40 **[0069]** Tanto hu4D5 como 4D5 demuestran actividad antiproliferativa contra células de carcinoma que expresan en exceso p185<sup>HER2</sup> (Carter y col., Proc Natl Acad Sci U S A 89(10):4285-9 (1992b); Hudziak y col., Mol Cell Biol 9(3):1165-72 (1989)). La forma IgG de hu4D5-8 (Herceptin R; trastuzumab) se usa como agente terapéutico en el tratamiento de cáncer de mama (revisado por McKeage, K. & Perry, C. M., Drugs 62(1):209-43 (2002)).

**[0070]** En general, un anticuerpo humanizado tiene preferentemente uno o más residuos de aminoácidos 45 introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente en lo sucesivo residuos de “importación”, que se toman normalmente de un dominio variable de “importación”. La humanización puede realizarse 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 secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos “humanizados” son anticuerpos 50 quiméricos (patente de EE.UU. nº 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de un especie no humana. En la práctica, los anticuerpos

humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

**[0071]** La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado procedimiento "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocido. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor es entonces aceptada como la región estructural 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 estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993).

**[0072]** Es adicionalmente importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento preferido, anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias del receptor y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como aumento de la afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y principalmente sustancialmente implicados en influir la unión a antígeno.

**[0073]** El Ejemplo 1 más adelante describe la producción de un anticuerpo anti-ErbB2 humanizado a modo de ejemplo. El anticuerpo humanizado en el presente documento puede comprender, por ejemplo, residuos de la región hipervariable no humana incorporados en un dominio pesado variable humano y puede comprender además una sustitución de la región estructural (FR) en una posición seleccionada del grupo que consiste en R66(V<sub>L</sub>), A71(V<sub>H</sub>), T73(V<sub>H</sub>), A78(V<sub>H</sub>) y S93(V<sub>H</sub>) utilizando el sistema de numeración del dominio variable expuesto 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 FR en dos o todas las posiciones R66(V<sub>L</sub>), A71(V<sub>H</sub>), T73(V<sub>H</sub>), A78(V<sub>H</sub>) y S93(V<sub>H</sub>).

### **Anticuerpos humanos**

**[0074]** Como una alternativa a la humanización pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que tras la inmunización pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J<sub>H</sub>) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en tales ratones mutantes en la línea germinal producirá la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, 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 las patentes de EE.UU. nº 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

**[0075]** Alternativamente, la tecnología de expresión en fago (McCafferty y col., *Nature* 348, 552-553 (1990)) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro* a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes sin inmunizar. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en marco en un gen de la proteína de la cubierta tanto principal como minoritario de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd, y se muestran como fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. Las muestras de fago pueden realizarse en una variedad de formas; para su revisión véanse, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes de V para la expresión en fago. Clackson y col., *Nature* 352, 624-628 (1991) aislaron una matriz diferente de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes de V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un

repertorio de genes V de donantes humanos sin inmunizar y los anticuerpos con respecto a una matriz diferente de antígenos (incluyendo autoantígenos) pueden aislarse 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). Véase, por tanto, las patentes de EE.UU. nº 5.565.332 y 5.573.905.

- 5 **[0076]** Como se ha tratado anteriormente, los anticuerpos humanos también pueden generarse por linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de EE.UU. 5.567.610 y 5.229.275).

**[0077]** Anticuerpos anti-ErbB2 humanos se describen en la patente de EE.UU. nº 5.772.997 concedida el 30 de junio de 1998 y el documento WO 97/00271 publicado el 3 de enero de 1997.

### **Fragmentos de anticuerpos**

- 10 **[0078]** Se contemplan fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios variables de la cadena ligera y/o pesada variantes descritos en el presente documento. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan y col., Science, 229:81 (1985)).
- 15 **[0079]** Sin embargo, otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico habitual. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden ahora producirse directamente por células huésped recombinantes. En una realización, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., Nature, 348:552-554 (1990). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> pueden aislarse directamente de cultivo de células huésped recombinantes.
- 20 Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992)).

- [0080]** En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; la patente de EE.UU. nº 5.571.894; y la patente de EE.UU. nº 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en la patente de
- 25 EE.UU. 5.641.870. Tales fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

### **Anticuerpos biespecíficos**

- [0081]** Se contemplan anticuerpos biespecíficos que comprenden el sitio de unión de las variantes de anticuerpos anti-HER2 descritas en el presente documento. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopes diferentes. Los anticuerpos biespecíficos a modo de
- 30 ejemplo pueden unirse a dos epítopes diferentes de la proteína del receptor ErbB2. Otros de tales anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a ErbB2 con sitio(s) de unión para EGFR, ErbB3 y/o ErbB4. Alternativamente, un brazo anti-ErbB2 puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante sobre un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), de manera que centren y localicen mecanismos de defensa
- 35 celular para la célula que expresa ErbB2. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan ErbB2. El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo anti-ErbB2/anti-FcγRIII biespecífico y la patente de EE.UU. nº 5.837.234 desvela un anticuerpo anti-ErbB2/anti-FcγRI biespecífico. Un anticuerpo anti-ErbB2/Fcγ biespecífico se muestra en el documento WO98/02463. La patente de EE.UU. nº 5.821.337 enseña un anticuerpo anti-ErbB2/anti-CD3 biespecífico.
- 40 **[0082]** Los procedimientos para producir anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina en los que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature, 305:537 (1993)). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos
- 45 hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace normalmente por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante embarazosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se desvelan en el documento WO 93/08829 y en Traunecker y col., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).
- [0083]** Según un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión
- 50 deseadas (sitios que combinan anticuerpo-antígeno) están fusionados a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (C<sub>H</sub>1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena

ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias  
5 codificantes para las dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de los polipéptidos en relaciones iguales produzca altos rendimientos o cuando las relaciones no sean de significancia particular.

**[0084]** En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de la inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de  
10 cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina híbrido (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 combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de la inmunoglobulina en sólo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles de generación de anticuerpos biespecíficos  
15 véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986). Según otro enfoque descrito en la patente de EE.UU. nº 5.731.168, la superficie de separación entre un par de moléculas de anticuerpos puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de separación preferida comprende al menos una parte del dominio C<sub>H</sub>3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la superficie de  
20 separación de la primera molécula de anticuerpo están sustituidos con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean sobre la superficie de separación de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales  
25 como homodímeros.

**[0085]** Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico. Brennan y col., *Science*, 229:81 (1985), describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden  
30 proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar ditioles vecinos y prevenir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte entonces en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro Fab'-TNB derivado para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

**[0086]** El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992), describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')<sub>2</sub>. Cada  
35 fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. Por tanto, el anticuerpo biespecífico formado podía unirse a células que expresan en  
40 exceso el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, además de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

**[0087]** También se han descrito diversas técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de  
45 cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y entonces se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para  
50 producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado con un dominio variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) por un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un fragmento están obligados a aparearse con los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> complementarios de otro fragmento, formándose así dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpos  
55 biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv (sFv). Véase, Gruber y col., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

**[0088]** Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt y col., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

**Modificaciones de secuencias de aminoácidos**

**[0089]** Se contemplan modificación (modificaciones) de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos. Por ejemplo, puede desearse mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de un anticuerpo. Pueden prepararse variantes de la secuencia de aminoácidos introduciendo cambios apropiados de nucleótidos en el ácido nucleico que codifica la variante de anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de las variantes de anticuerpos. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se hace para llevar a la construcción final, a condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar el procesamiento postraduccional de variantes de anticuerpos tales como cambiar el número o posición de sitios de glucosilación.

**[0090]** Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones de los anticuerpos que son las localizaciones preferidas para mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido con alanina" como se describe por Cunningham y Well, Science, 244:1081-1085 (1989). Aquí se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen con un aminoácido neutro o negativamente cargado (lo más preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con un antígeno particular. Entonces, aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo más u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, mientras que el sitio para la introducción de una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación por sí misma no necesita predeterminarse. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, el barrido con ala o la mutagénesis al azar se realiza en el codón o región diana y las variantes de anticuerpos expresadas se criban para la actividad deseada.

**[0091]** Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que oscilan en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, además de inserciones secuencia dentro de la secuencia de un único o múltiples residuos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen una variante de anticuerpo con un residuo de metionilo en el extremo N o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

**[0092]** Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituida con un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "Sustituciones conservativas preferidas". Si tales sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces cambios más sustanciales, denominados "Sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla 1, o como se describen adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, pueden introducirse y cribarse los productos. Las variantes de sustitución de aminoácidos más preferidas se describen en los siguientes ejemplos.

Tabla 1

Residuo original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones conservativas 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)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

5 **[0093]** Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se llevan a cabo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) la masa de la cadena lateral.

10 **[0094]** Residuos que se producen naturalmente pueden dividirse en grupos basándose en propiedades de cadenas laterales comunes:

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) neutros hidrófilos: cys, ser, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

15 (5) residuos que influyen en la orientación de cadenas: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

**[0095]** Las sustituciones no conservativas supondrán el intercambio de un miembro de una de estas clases con otra clase.

**[0096]** Cualquier residuo de cisteína que no participe en el mantenimiento de la conformación apropiada de las variantes de anticuerpos también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir reticulación anómala. En cambio, el (los) enlace(s) de cisteína puede(n) añadirse al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

**[0097]** Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) puede(n) seleccionarse basándose en sus propiedades biológicas. Como tales, variante(s) seleccionada(s) para el posterior desarrollo pueden haber mejorado las propiedades biológicas con respecto al anticuerpo parental del que se generan, tal como afinidad de unión potenciada. Una forma conveniente para generar tales variantes sustitucionales implica maduración por afinidad usando expresión en fago, tratada más adelante.

**[0098]** También puede desearse modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, de forma que se potencie la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede lograrse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente, o adicionalmente, el (los) residuo(s) de cisteína puede(n) introducirse en la región Fc, permitiendo así la formación del enlace disulfuro entre cadenas en esta región. Por tanto, el anticuerpo homodimérico generado puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción de células mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) elevadas. Véase Caron y col., J. Exp Med, 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B., J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada también pueden prepararse usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff y col., Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, un anticuerpo puede manipularse, teniendo regiones Fc duales y así puede tener lisis del complemento y capacidades de ADCC potenciadas. Véase Stevenson y col., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

**[0099]** Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo puede incorporarse un epítipo de unión al receptor silvestre en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5.739.277. Como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión al receptor silvestre" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub>) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

### **Maduración por afinidad**

**[0100]** La maduración por afinidad puede producir anticuerpos con afinidad mejorada, en comparación con el anticuerpo parental. La diversidad de secuencias en anticuerpos que se producen naturalmente se produce en linfocitos B con la recombinación de diversos segmentos de genes seleccionados con eventos de escisión imprecisos, inserciones de nucleótidos y transposiciones de genes secundarias, seguido durante la maduración de la respuesta de inmunoglobulina por transposiciones de genes secundarias y mutaciones puntuales. Estos cambios sirven para potenciar la especificidad y eficacia de la respuesta inmunitaria mediante la selección de clones de linfocitos B que producen anticuerpos de afinidad y especificidad creciente.

**[0101]** El procedimiento de maduración por afinidad se ha imitado eficazmente *in vitro* usando bibliotecas de diversidad de anticuerpos expresadas en fago, levadura u otros huéspedes (revisado por Hoogenboom, H. R. & Chames, P., Immunol Today 21(8):371-8 (2000); Maynard, J. & Georgiou, G., Annu Rev Biomed Eng 2:339-76 (2000); Rader, C. & Barbas, C. F., 3rd., Curr Opin Biotechnol 8(4):503-8 (1997)). En particular, la expresión en fago puede realizarse en una variedad de formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993).

**[0102]** En un enfoque, secuencias de nucleótidos que codifican sitios de regiones hipervariables de anticuerpos de interés se mutan para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las secuencias mutadas se clonan en marco en tanto un gen de la proteína de la envoltura principal como secundaria de un bacteriófago filamentosos y se expresan en fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula de fago.

**[0103]** La expresión es monovalente si un único fragmento de anticuerpo es expresado por célula de fago. La expresión monovalente puede llevarse a cabo con el uso de fagémido y fago auxiliar como se describe, por ejemplo,

en Lowman, H. B., *Methods Mol Biol* 87:249-64 (1998). Un fago preferido es M13 y la expresión es preferentemente como una proteína de fusión con proteína 3 de la envoltura como se describe en Lowman y col., arriba. Otro fago adecuado incluye fago filamentoso fl y fd. También se conoce la expresión de proteínas de fusión con otras proteínas de la envoltura de virus y puede usarse en la presente invención. Véase la patente de EE.UU. nº 5.223.409. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta aquellas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. En particular, las variantes de expresión en fago pueden cribarse para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. La posterior selección de variantes con propiedades biológicas particulares (por ejemplo, alta afinidad de unión) y el continuado re-cribado de y re-selección de la población de variantes seleccionadas permite la identificación de variantes con mejoras en la actividad biológica cribada, tal como aumento de la afinidad por un antígeno particular.

**[0104]** La mutagénesis por barrido con alanina puede realizarse para identificar sitios de la región hipervariable candidatos para modificación. Aquellos residuos de la región hipervariable identificados como que contribuyen significativamente a la unión a antígeno son candidatos para modificación. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y un antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para desarrollo adicional, como se ha tratado anteriormente.

**[0105]** El procedimiento de maduración por afinidad puede producir mejoras sorprendentes en la afinidad en comparación con el anticuerpo parental. Un estudio en el ratón mostró mejoras de  $10\text{-}10^3$  veces en  $K_D$  durante la maduración por afinidad *in vivo* (Foote, J. & Milstein, C., *Nature* 352(6335):530-2 (1991)). Usando una biblioteca de scFv expresada en levadura, Wittrup y colaboradores pudieron mejorar la afinidad de unión de un anticuerpo >1000 veces, a 48 fM ( $K_D=4,8 \times 10^{-14}$  M; (Boder y col., *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20):10701-5 (2000)). Igualmente de sorprendente es el hecho de que un pequeño número de mutaciones pueda algunas veces afectar estos cambios. Por ejemplo, las afinidades de unión a antígeno mejoraron 16 veces en un mutante puntual CDR-L3 de otro anticuerpo anti-erbB2 (Schier y col., *J Mol Biol* 263(4):551-67 (1996)), 14 veces en un mutante puntual CDR-H3 de un anti-VEGF (Chen y col., *J Mol Biol* 293(4):865-81 (1999)) y 8 veces en un mutante puntual CDR-H3 de un anticuerpo anti-gp120 (Barbas y col., *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9):3809-13 (1994)).

#### **Cribado de anticuerpos con propiedades deseadas**

**[0106]** Después de generar anticuerpos de variante pueden seleccionarse adicionalmente aquellos con características biológicas particulares, según se desee.

**[0107]** Por ejemplo, pueden cribarse anticuerpos con una afinidad de unión deseada. Como se trata más adelante en el ejemplo, bibliotecas de Fab expresadas en fago pueden clasificarse basándose en la afinidad de unión. Brevemente, fragmentos de anticuerpos derivados de anticuerpos particulares pueden expresarse en fago y organizarse en bibliotecas. Las bibliotecas pueden luego someterse a rondas de rigurosidad creciente de selección por unión a antígeno usando concentraciones decrecientes de antígeno.

**[0108]** Además, pueden identificarse anticuerpos de alta afinidad determinando la afinidad de unión y cinética de una población de anticuerpos. En una realización, las mediciones de afinidad de unión por resonancia de plasmones superficiales (SPR) pueden realizarse como se describe en los ejemplos más adelante. Brevemente, fragmentos de anticuerpos se derivan de los anticuerpos de interés. Un sistema de análisis de interacción cinética en tiempo real BIAcore-2000 o BIAcore-3000 (Biacore Inc., Piscataway, NJ) puede luego usarse para determinar las constantes de asociación ( $k_{as}$ ) y disociación ( $k_{dis}$ ) (Karlsson, R., Michaelsson, A. & Mattsson, L., *J Immunol Methods* 145(1-2):229-40 (1991)) de los fragmentos de anticuerpos en interacciones de unión con antígeno inmovilizado, según las instrucciones de fabricación. Una constante de equilibrio,  $K_D$ , puede calcularse a partir de  $k_{dis}/k_{as}$ , como se conoce en la técnica. Las diferencias en la energía libre, en comparación con anticuerpo natural, pueden calcularse como se ha descrito (Wells, J. A., *Biochemistry* 29(37), 8509-17 (1990)):  $\Delta\Delta G = -R_T \ln (K_D^{(mutante)} / K_D^{(natural)})$ .

**[0109]** Además, en una realización, para identificar anticuerpos anti-ErbB2 inhibidores del crecimiento, puede cribarse para anticuerpos que inhiben el crecimiento de células cancerosas que expresan en exceso ErbB2. En una realización, un anticuerpo inhibidor del crecimiento puede inhibir el crecimiento de células SK-BR-3 en cultivo celular aproximadamente el 20-100% y preferentemente aproximadamente el 50-100% a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30  $\mu\text{g/ml}$ . Para identificar tales anticuerpos puede realizarse el ensayo de SK-BR-3 descrito en la patente de EE.UU. nº 5.677.171. Según este ensayo, células SK-BR-3 se cultivan en una mezcla 1:1 de medio F12 y DMEM complementado con 10% de suero bovino fetal, glutamina y penicilina-estreptomicina. Las

células SK-BR-3 se siembran a 20.000 células en una placa de cultivo celular de 35 mm (2 ml/35 mm de placa). 0,5 a 30 µg/ml del anticuerpo anti-ErbB2 se añaden por pocillo. Después de seis días se cuenta el número de células, en comparación con células sin tratar usando un contador de células COULTER™ electrónico. Aquellos anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SK-BR-3 aproximadamente el 20-100%, y más preferentemente 5 aproximadamente el 50-100%, pueden seleccionarse como anticuerpos inhibidores del crecimiento.

**[0110]** Para seleccionar anticuerpos de variante que inducen muerte celular puede evaluarse la pérdida de integridad de la membrana como se indica por, por ejemplo, captación de PI, azul de tripano o 7AAD con respecto al control. El ensayo preferido es el ensayo de captación de PI usando células BT474. Según este ensayo, células BT474 (que pueden obtenerse de la Colección americana de cultivos tipo (Rockville, MD)) se cultivan en medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM):Ham's F-12 (50:50) complementado con 10% de SBF inactivado con calor (Hyclone) y L-glutamina 2 mM. (Por tanto, el ensayo se realiza en ausencia de células efectoras del complemento e inmunitarias). Las células BT474 se siembran a una densidad de  $3 \times 10^6$  por placa en placas de 100 x 20 mm y se deja que se unan durante la noche. Entonces, el medio se elimina y se sustituye con medio fresco solo o medio que contiene 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal apropiado. Las células se incuban durante un periodo de tiempo de 3 días. Tras cada tratamiento, las monocapas se lavan con PBS y se desprenden por tripsinación. Entonces, las células se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C, el sedimento se resuspende en 3 ml de tampón de unión a  $Ca^{2+}$  helado (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM,  $CaCl_2$  2,5 mM) y se toman alícuotas en 12 x 75 tubos con tapa de filtro de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de coágulos de células. Entonces, los tubos reciben PI (10 µg/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Aquellos anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular como se ha determinado por captación de PI pueden seleccionarse como anticuerpos inductores de muerte celular.

**[0111]** También pueden seleccionarse anticuerpos que inducen apoptosis. Un ensayo de unión a anexina usando células BT474 puede usarse para identificar estos anticuerpos. Las células BT474 se cultivan y se siembran en placas como se trata en el párrafo precedente. Entonces, el medio se elimina y se sustituye con medio fresco solo o medio que contiene 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal. Tras un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se desprenden por tripsinación. Entonces, las células se centrifugan, se resuspenden en tampón de unión a  $Ca^{2+}$  y se toman alícuotas en tubos como se ha tratado anteriormente para el ensayo de muerte celular. Entonces, los tubos reciben anexina marcada (por ejemplo, anexina V-FTIC) (1 µg/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Aquellos anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina con respecto al control se seleccionan como anticuerpos inductores de apoptosis.

**[0112]** Además del ensayo de unión a anexina, un ensayo de tinción de ADN usando células BT474 puede usarse para identificar anticuerpos que inducen apoptosis. Con el fin de realizar este ensayo, células BT474 que han sido tratadas con el anticuerpo de interés, como se ha descrito en los dos párrafos precedentes, se incuban con 9 µg/ml de HOECHST 33342™ durante 2 h a 37°C, luego se analizan sobre 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 o mayor (y preferentemente 3 veces o mayor) que las células sin tratar (hasta el 100% de células apoptóticas) pueden seleccionarse como anticuerpos pro-apoptóticos usando este ensayo.

**[0113]** En otra realización, un anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor de ErbB puede seleccionarse determinando la capacidad del anticuerpo para bloquear la unión del ligando de ErbB a células que expresan el receptor de ErbB (por ejemplo, en conjugación con otro receptor de ErbB con el que el receptor de ErbB de interés forma un hetero-oligómero de ErbB). Por ejemplo, células que expresan naturalmente, o transfectadas para expresar, receptores de ErbB del hetero-oligómero de ErbB pueden incubarse con el anticuerpo y luego exponerse a ligando de ErbB marcado. Entonces puede evaluarse la capacidad del anticuerpo anti-ErbB2 para bloquear la unión del ligando al receptor de ErbB en el hetero-oligómero de ErbB.

**[0114]** Por ejemplo, la inhibición de la unión de HRG a líneas celulares MCF7 de tumor de mama por anticuerpos anti-ErbB2 puede realizarse usando cultivos de MCF7 de monocapa sobre hielo en un formato de placa de 24 pocillos como se describe esencialmente en el Ejemplo 1 más adelante. Los anticuerpos monoclonales anti-ErbB2 pueden añadirse a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos. Luego puede añadirse rHRGβ1<sup>177-224</sup> marcado con <sup>125</sup>I (25 pm), y la incubación puede continuar durante 4 a 16 horas. Pueden hacerse las curvas de respuesta a dosis y puede calcularse un valor de  $CI_{50}$  para el anticuerpo de interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor de ErbB tendrá una  $CI_{50}$  para inhibir la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la  $CI_{50}$  para inhibir la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo puede ser, por ejemplo, aproximadamente 100 nM o menos, más preferentemente 50 nM o menos.

**[0115]** Alternativamente, o adicionalmente, puede evaluarse la capacidad de variantes de anticuerpos anti-ErbB2 para bloquear la fosforilación de tirosina estimulada por ligando de ErbB de un receptor de ErbB presente en un hetero-oligómero de ErbB. Por ejemplo, células que expresan endógenamente los receptores de ErbB o transfectadas para expresarlos pueden incubarse con el anticuerpo y luego ensayarse para actividad de fosforilación de tirosina dependiente de ligando de ErbB usando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (que está opcionalmente conjugado con una marca detectable). El ensayo de activación del receptor de cinasas descrito en la patente de EE.UU. n° 5.766.863 también está disponible para determinar la activación del receptor de ErbB y bloquear esa actividad por un anticuerpo.

**[0116]** En una realización puede cribarse un anticuerpo que inhibe la estimulación con HRG de la fosforilación de p180 tirosina en células MCF7. Por ejemplo, las células MCF7 pueden sembrarse en placas de 24 pocillos y anticuerpos monoclonales para ErbB2 pueden añadirse a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente; entonces, rHRG $\beta$ <sub>177-244</sub> puede añadirse a cada pocillo a una concentración final de 0,2 nM, y la incubación puede continuar durante 8 minutos. El medio puede aspirarse de cada pocillo, y las reacciones pueden detenerse mediante la adición de 100  $\mu$ l de tampón de muestra SDS (5% de SDS, DTT 25 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25  $\mu$ l) puede someterse a electroforesis sobre un gel del 4-12% de gradiente (Novex) y luego transferirse electroforéticamente a membrana de poli(difluoruro de vinilideno). Las inmunotransferencias de anti-fosfotirosina (a 1  $\mu$ g/ml) pueden revelarse, y la intensidad de la banda reactiva predominante a  $M_r$  ~180.000 puede cuantificarse por densitometría de reflectancia. El anticuerpo seleccionado inhibirá preferentemente significativamente la estimulación con HRG de la fosforilación de p180 tirosina a aproximadamente el 0-35% del control en este ensayo. Puede hacerse una curva de dosis-respuesta para la inhibición de la estimulación con HRG de la fosforilación de p180 tirosina como se ha determinado por densitometría de reflectancia y puede calcularse una  $CI_{50}$  para el anticuerpo de interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor de ErbB tendrá una  $CI_{50}$  para inhibir la estimulación con HRG de la fosforilación de p180 tirosina en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la  $CI_{50}$  para inhibir la estimulación con HRG de la fosforilación de p180 tirosina en este ensayo puede ser, por ejemplo, aproximadamente 100 nM o menos, más preferentemente 50 nM o menos.

**[0117]** También pueden evaluarse los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo sobre células MDA-MB-175, por ejemplo, esencialmente como se describe en Schaefer y col., *Oncogene* 15:1385-1394 (1997). Según este ensayo, células MDA-MB-175 pueden tratarse con el anticuerpo monoclonal anti-ErbB2 (10  $\mu$ g/ml) durante 4 días y teñirse con cristal violeta. La incubación con un anticuerpo anti-ErbB2 pueden mostrar un efecto inhibidor del crecimiento sobre esta línea celular similar al mostrado por el anticuerpo monoclonal 2C4. En otra realización, HRG exógeno no invertirá significativamente esta inhibición. Preferentemente, el anticuerpo podrá inhibir la proliferación celular de células MDA-MB-175 a un grado mayor que el anticuerpo monoclonal 4D5, tanto en presencia como ausencia de HRG exógeno.

**[0118]** En una realización, las variantes de anticuerpos anti-ErbB2 de interés pueden bloquear la asociación dependiente de heregulina de ErbB2 con ErbB3 en tanto células MCF7 como SK-BR-3 como se ha determinado en un experimento de co-inmunoprecipitación sustancialmente más eficazmente que el anticuerpo monoclonal 4D5. Para cribar anticuerpos que se unen a un epítipo sobre ErbB2 unido por un anticuerpo de interés puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, o adicionalmente, el mapeo de epítopes puede realizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

**[0119]** Los resultados obtenidos en los ensayos basados en células descritos anteriormente pueden luego ir seguidos de pruebas en animal, por ejemplo, modelos murinos y ensayos clínicos humanos. En particular, la capacidad de una variante de anticuerpo para tratar ErbB2 que expresa en exceso tumores puede demostrarse en el modelo de ratón transgénico desvelado en la solicitud de patente en tramitación junto con la presente n° 09/811115.

### **Inmunconjugados**

**[0120]** La invención también se refiere a inmunconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

**[0121]** Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunconjugados se han descrito anteriormente. Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcinas, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, maitansinoides, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de

*Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecnos. Está disponible una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  y  $^{186}\text{Re}$ .

**[0122]** Se preparan conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col. (1987) Science, 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

**[0123]** En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en la elección previa como diana de tumores en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de eliminación y luego administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido). En una realización preferida, el anticuerpo está conjugado con un maitansinoide como se describe en la solicitud pendiente de tramitación nº 09/811123.

## 20 Formulaciones farmacéuticas

**[0124]** Formulaciones terapéuticas de las variantes de anticuerpos usadas según la presente invención se preparan mezclando un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)) en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Formulaciones de anticuerpos anti-ErbB2 liofilizadas preferidas se describen en el documento WO 97/04801, expresamente incorporado en el presente documento por referencia.

**[0125]** La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, puede desearse adicionalmente proporcionar anticuerpos o conjugados de anticuerpo que se unen a EGFR, ErbB2 (por ejemplo, un anticuerpo que se une a un epítipo diferente sobre ErbB2), ErbB3, ErbB4, o factor endotelial vascular (VEGF) en una formulación. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender adicionalmente un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

**[0126]** Los principios activos también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

**[0127]** Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo cuyas matrices están en la forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsula. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato

de  $\gamma$ -etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

**[0128]** Las formulaciones que van a usarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

**[0129]** En una realización, la formulación comprende 5 mg/ml de hu4D5-8 de variante, 100 mg/ml de sacarosa, 0,1% de polisorbato 20 y succinato de sodio 10 mM a pH 5,0.

**[0130]** Tratamiento con variantes de anticuerpos anti-ErbB2.

**[0131]** Se contempla que variantes de anticuerpos anti-ErbB2 puedan usarse para tratar diversas enfermedades o trastornos. Afecciones o trastornos a modo de ejemplo incluyen tumores benignos o malignos; leucemias y tumores malignos linfoides; otros trastornos tales como trastornos neuronales, de la glía, astrocíticos, hipotalámicos, glandulares, macrófágicos, epiteliales, del estroma, blastocélicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

**[0132]** Generalmente, la enfermedad o trastorno que va a tratarse es cáncer. Ejemplos de cáncer que van a tratarse en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, además de cáncer de cabeza y cuello.

**[0133]** Preferentemente, las variantes de anticuerpos se usan para tratar cáncer de mama. El cáncer comprenderá células que expresan ErbB, de forma que un anticuerpo anti-ErbB en el presente documento puede unirse al cáncer, y normalmente se caracterizará por la expresión en exceso del receptor de ErbB. En una realización preferida, el cáncer comprende células que expresan ErbB, incluso más preferentemente células que se caracterizan por la expresión en exceso del receptor de ErbB2. Para determinar ErbB, por ejemplo, la expresión de ErbB2 en el cáncer, están disponibles diversos ensayos de diagnóstico/pronóstico. En una realización, la expresión en exceso de ErbB2 puede analizarse por inmunohistoquímica (IHC), por ejemplo, usando HERCEPTEST® (Dako). Secciones de tejido incorporadas en parafina de una biopsia de tumor pueden someterse al ensayo de IHC y conferírseles un criterio de intensidad de tinción de proteína ErbB2 del siguiente modo:

Puntuación 0	No se observa tinción o se observa tinción de la membrana en menos del 10% de las células tumorales.
Puntuación 1+	Se detecta una tinción débil/escasamente perceptible en más del 10% de las células tumorales. Las células sólo están tenidas en parte de su membrana.
Puntuación 2+	Se detecta una tinción de la membrana completa de débil a moderada en más del 10% de las células tumorales.
Puntuación 3+	Se detecta una tinción de la membrana completa de moderada a fuerte en más del 10% de las células tumorales.

35

**[0134]** Aquellos tumores con puntuaciones 0 ó 1+ para la evaluación de la expresión en exceso de ErbB2 pueden caracterizarse como que no expresan en exceso ErbB2, mientras que aquellos tumores con puntuaciones 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que expresan en exceso ErbB2.

**[0135]** Alternativamente, o adicionalmente, los ensayos de hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) tales como los ensayos INFORM™ (comercializados por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (Vysis, Illinois) pueden llevarse a cabo sobre tejido tumoral fijado en formalina incorporado en parafina para determinar el grado (si lo hay) de expresión en exceso de ErbB2 en el tumor. En comparación con el ensayo de IHC, el ensayo de FISH, que mide la amplificación génica de *her2*, parece establecer una correlación mejor con la respuesta de pacientes a tratamiento

con anticuerpos anti-HER2, y actualmente se considera que es el ensayo preferido para identificar pacientes que probablemente se beneficiarán del tratamiento con anticuerpos anti-HER2 (por ejemplo, tratamiento con HERCEPTIN<sup>®</sup> comercialmente disponible) o tratamiento con las variantes de la presente invención. Preferentemente, las variantes de la presente invención y/o la proteína ErbB, por ejemplo ErbB2, con la que se unen son  
5 internalizadas por la célula, produciendo aumento de la eficacia terapéutica de la variante en la destrucción de la célula cancerosa con la que se unen. En una realización preferida, un agente citotóxico, tal como un maitansinoide, elige como diana o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa.

**[0136]** Las variantes de anticuerpos anti-ErbB se administran a un mamífero, preferentemente a un paciente humano, según procedimientos conocidos tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por  
10 infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Se prefiere administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo.

**[0137]** Otras pautas terapéuticas pueden combinarse con la administración de las variantes de anticuerpos anti-ErbB. La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una única  
15 formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferentemente hay un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

**[0138]** El paciente puede tratarse con dos o más anticuerpos anti-ErbB diferentes, al menos uno de los cuales está en forma de una variante. Por ejemplo, el paciente puede tratarse con una primera variante de anticuerpo anti-  
20 ErbB2 en la que el anticuerpo es inhibidor del crecimiento, y un segundo anticuerpo anti-ErbB2 o inmunoconjugado de anticuerpo, por ejemplo, un conjugado anticuerpo-maitansinoide, que bloquea la activación del ligando de un receptor de ErbB (por ejemplo, 2C4 o una variante humanizada y/o madurada por afinidad de la misma) o induce apoptosis de una célula que expresa en exceso ErbB2 (por ejemplo, 7C2, 7F3 o variantes humanizadas y/o  
25 maduradas por afinidad de la misma). El tratamiento puede implicar la administración de anticuerpos que se unen específicamente a dos o más receptores de ErbB diferentes tales como, por ejemplo, receptores de ErbB2 y EGFR, en los que al menos uno de los anticuerpos anti-ErbB es una variante de hu4D5-8. Preferentemente, tal terapia combinada produce un efecto terapéutico sinérgico.

**[0139]** También puede desearse combinar la administración de las variantes de anticuerpos anti-ErbB con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno asociado a tumor, que no es miembro de la familia de  
30 receptores de ErbB. El otro anticuerpo en este caso puede unirse, por ejemplo, a factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y puede estar en forma de un conjugado de maitansinoide, u otro inmunoconjugado.

**[0140]** El tratamiento puede implicar la administración combinada de una variante de anticuerpo anti-ErbB2 (o variantes) y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, que incluye  
35 coadministración de mezclas de diferentes agentes quimioterapéuticos. Agentes quimioterapéuticos preferidos incluyen taxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. La preparación y programas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse según instrucciones del fabricante o según se determine empíricamente por el médico habitual. La preparación y programas de dosificación para tal quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

**[0141]** El tratamiento puede iniciarse con una variante de anticuerpos anti-ErbB, seguido de tratamiento de  
40 mantenimiento con un anticuerpo anti-ErbB parental.

**[0142]** Las variantes de anticuerpos pueden combinarse con un compuesto antihormonal; por ejemplo, un compuesto antiestrogénico tal como tamoxifeno; una antiprogesterona tal como onapristona (véase el documento EP  
45 616 812); o un antiandrógeno tal como flutamida, en dosificaciones conocidas para tales moléculas. Si el cáncer que va a tratarse es cáncer independiente de hormonas, el paciente puede haberse sometido previamente a terapia antihormonal y, después de que el cáncer se convierta en independiente de hormonas, el anticuerpo anti-ErbB (y opcionalmente otros agentes como se describen en el presente documento) puede administrarse al paciente. Algunas veces también puede ser beneficioso coadministrar un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada a la terapia) o una o más citocinas al paciente. Además de las pautas terapéuticas anteriores, el paciente puede someterse a eliminación quirúrgica de células cancerosas y/o radioterapia.

**[0143]** Dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes anteriormente coadministrados son aquellas  
50 presentemente usadas y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y anticuerpo anti-ErbB2.

**[0144]** Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de una variante de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, como se define anteriormente, la gravedad y  
55 evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la

historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico adjunto. La variante de anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. El proceso de esta terapia es fácilmente monitorizado por técnicas y ensayos convencionales.

### **Artículos de fabricación**

[0145] También se describe un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente se proporciona. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una variante de anticuerpo, según las presentes enseñanzas. En una realización, el recipiente es un vial de 10 cc que contiene 10 ml de una disolución que comprende una variante de anticuerpo descrita en el presente documento.

[0146] La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como cáncer. En una realización preferida, la etiqueta o prospectos indican que la composición se usa para tratar cáncer de mama. En otra realización, la etiqueta o prospectos indican que la composición que comprende una variante anticuerpo que se une a ErbB2 puede usarse para tratar cáncer que expresa un receptor de ErbB seleccionado del grupo que consiste en receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), ErbB2, ErbB3 y ErbB4, preferentemente EGFR. Además, la etiqueta o prospecto puede indicar que el paciente que va a tratarse es uno que tiene cáncer caracterizado por activación excesiva de un receptor de ErbB seleccionado de EGFR, ErbB2, ErbB3 o ErbB4. Por ejemplo, el cáncer puede ser uno que expresa en exceso uno de estos receptores y/o que expresa en exceso un ligando de ErbB (tal como TGF- $\alpha$ ). La etiqueta o prospecto también puede indicar que la composición puede usarse para tratar cáncer, en el que el cáncer no está caracterizado por expresión en exceso del receptor de ErbB2. En otras realizaciones, el prospecto puede indicar que la composición también puede usarse para tratar cáncer independiente de hormonas, cáncer de próstata, cáncer de colon o cáncer colorrectal.

[0147] Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende una variante de anticuerpo que se une a ErbB2 e inhibe el crecimiento de células cancerosas que expresan en exceso ErbB2; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende un segundo anticuerpo que se une a ErbB2 y bloquea la activación del ligando de un receptor de ErbB, o un conjugado de este segundo anticuerpo con un maitansinoide. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que la primera y segunda composiciones pueden usarse para tratar cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable tal como agua bacteriostática para inyección (BWFJ), solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Adicionalmente puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluye otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

[0148] Más detalles de la invención se ilustran en los siguientes ejemplos no limitantes.

### **Ejemplo 1**

[0149] Producción, caracterización y humanización de anticuerpo monoclonal anti-ErbB2 4D5 El anticuerpo monoclonal murino 4D5 que se une específicamente al dominio extracelular de ErbB2 se produjo como se describe en Fendly y col., Cancer Res 50(5):1550-8 (1990). Brevemente, células NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub> (que expresan aproximadamente  $1 \times 10^5$  moléculas de ErbB2 /célula) producidas como se describe en Hudziak y col., Mol Cell Biol 9(3):1165-72 (1989) se recogieron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía EDTA 25 mM y se usaron para inmunizar ratones BALB/c. A los ratones se les administraron inyecciones i.p. de  $10^7$  células en 0,5 ml de PBS en las semanas 0, 2, 5 y 7. A los ratones con antisueros que inmunoprecipitaron ErbB2 marcada con  $^{32}\text{P}$  se les administraron inyecciones i.p. de un extracto de membrana de ErbB2 purificada con aglutinina de germen de trigo-Sepharose (WGA) en las semanas 9 y 13. Esto fue seguido de una inyección i.v. de 0,1 ml de preparación de ErbB2 y los esplenocitos se fusionaron con la línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653. Los sobrenadantes de hibridomas se cribaron para unión a ErbB2 por ELISA y radioinmunoprecipitación.

### **Mapeo y caracterización de epítopes**

[0150] El epítipo de ErbB2 unido por anticuerpo monoclonal 4D5 se determinó por análisis de unión competitiva (Fendly y col., Cancer Res 50(5):1550-8 (1990)). Se hicieron estudios de bloqueo cruzado por

- fluorescencia directa sobre células intactas usando la máquina de cribado PANDEX™ para cuantificar fluorescencia. El anticuerpo monoclonal se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (FITC) usando procedimientos establecidos (Wofsy y col. Selected Methods in Cellular Immunology, pág. 287, Mishel y Schiigi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)). Monocapas confluentes de células NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub> se tripsinaron, se lavaron una vez y se resuspendieron a  $1,75 \times 10^6$  célula/ml en PBS frío que contenía 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,1% de NaN<sub>3</sub>. Una concentración final de 1% de partículas de látex (IDC, Portland, OR) se añadió para reducir la obstrucción de las membranas en placas PANDEX™. Las células en suspensión, 20  $\mu$ l, y 20  $\mu$ l de anticuerpos monoclonales purificados (100  $\mu$ g/ml a 0,1  $\mu$ g/ml) se añadieron a los pocillos de placas PANDEX™ y se incubaron sobre hielo durante 30 minutos. Una dilución predeterminada del anticuerpo monoclonal marcado con FITC en 20  $\mu$ l se añadió a cada pocillo, se incubó durante 30 minutos, se lavó y la fluorescencia se cuantificó por PANDEX™. Se consideró que los anticuerpos monoclonales compartían un epítipo si cada uno bloqueó la unión del otro el 50% o más en comparación con un control de anticuerpo monoclonal irrelevante. En este experimento, el anticuerpo monoclonal 4D5 se asignó al epítipo I (residuos de aminoácidos de aproximadamente 529 a aproximadamente 625, ambos incluidos, dentro del dominio extracelular de ErbB2 (residuos 22 a aproximadamente 645, ambos incluidos)).
- 15 **[0151]** El anticuerpo anti-HER2 4D5 monoclonal murino inhibe el crecimiento de líneas de células de cáncer de mama. Las características inhibitoras del crecimiento del anticuerpo monoclonal 4D5 se evaluaron usando la línea celular de tumor de mama, SK-BR-3 (véase Hudziak y col., Mol Cell Biol 9(3):1165-72 (1989)). Brevemente, células SK-BR-3 se desprendieron usando 0,25% (vol/vol) de tripsina y se suspendieron en medio completo a una densidad de  $4 \times 10^5$  células por ml. Las alícuotas de 100  $\mu$ l ( $4 \times 10^4$  células) se sembraron en placas de microdilución de 96 pocillos, se dejó que las células se adhirieran y luego se añadieron 100  $\mu$ l de medio solo o medio que contenía anticuerpo monoclonal (concentración final 5  $\mu$ g/ml). Después de 72 horas, las placas se lavaron dos veces con PBS (pH 7,5), se tiñeron con cristal violeta (0,5% en metanol) y se analizaron para proliferación celular relativa como se describe en Sugarman y col. Science 230:943-945 (1985). El anticuerpo monoclonal 4D5 inhibió la proliferación celular relativa de SK-BR-3 aproximadamente el 56%.
- 20 **[0152]** También se evaluó el anticuerpo monoclonal 4D5 para su capacidad para inhibir la fosforilación de tirosina estimulada por HRG de proteínas en el intervalo de  $M_r$  180.000 de lisados celulares completos de células MCF7 (Lewis y col. Cancer Research 56:1457-1465 (1996)). Se informa que células MCF7 expresan todos los receptores de ErbB conocidos, pero a niveles relativamente bajos. Como ErbB2, ErbB3 y ErbB4 tienen tamaños moleculares casi idénticos, no es posible distinguir qué proteína está siendo fosforilada con tirosina cuando los lisados celulares completos se evalúan por análisis de transferencia Western. Sin embargo, estas células son ideales para ensayos de fosforilación de tirosina con HRG debido a que bajo las condiciones de ensayo usadas, en ausencia de HRG exógenamente añadida, presentan niveles de bajos a indetectables de proteínas de fosforilación de tirosina en el intervalo de  $M_r$  180.000.
- 25 **[0153]** Se sembraron células MCF7 en placas de 24 pocillos y anticuerpos monoclonales para ErbB2 se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente; luego se añadió rHRG $\beta$ 1<sub>177-244</sub> a cada pocillo a una concentración final de 0,2 nM, y la incubación continuó durante 8 minutos. El medio se aspiró cuidadosamente de cada pocillo, y las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100  $\mu$ l de tampón de muestra SDS (5% de SDS, DTT 25 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25  $\mu$ l) se sometió a electroforesis sobre un gel de 4-12% de gradiente (Novex) y luego se transfirió electroforéticamente a membrana de poli(difluoruro de vinilideno). Las inmunotransferencias de anti-fosfotirosina (4G10, de UBI, usadas a 1  $\mu$ g/ml) se revelaron, y la intensidad de la banda de reactivo predominante a  $M_r$  180.000 se cuantificó por densitometría de reflectancia, como se ha descrito previamente (Holmes y col. Science 256:1205-1210 (1992); Sliwkowski y col. J. Biol. Chem. 269:14661-14665 (1994)). El anticuerpo monoclonal 4D5 inhibió significativamente la generación de una señal de fosforilación de tirosina inducida por HRG a  $M_r$  180.000 en ausencia de HRG, pero fue incapaz de estimular fosforilación de tirosina de proteínas en el intervalo de  $M_r$  180.000. Por tanto, este anticuerpo no reacciona de forma cruzada con EGFR (Fendly y col., Cancer Res 50(5):1550-8 (1990)), ErbB3, o ErbB4. El anticuerpo monoclonal 4D5 pudo bloquear la estimulación con HRG de la fosforilación de tirosina -50%.
- 30 **[0154]** Se evaluó el efecto inhibitor del crecimiento de anticuerpo monoclonal 4D5 sobre células MDA-MB-175 y SK-BR-3 en presencia o ausencia de rHRG $\beta$ 1 exógeno (Schaefer y col., Oncogene 15:1385-1394 (1997)). Niveles de ErbB2 en células MDA-MB-175 son 4-6 veces superiores al nivel encontrado en células epiteliales de mama normales y el receptor de ErbB2-ErbB4 es constitutivamente fosforilado por tirosina en células MDA-MB-175. El anticuerpo monoclonal 4D5 pudo inhibir la proliferación celular de células MDA-MB-175, tanto en presencia como en ausencia de HRG exógena. La inhibición de la proliferación celular por 4D5 depende del nivel de expresión de ErbB2 (Lewis y col., Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263 (1993)). Pudo detectarse una inhibición máxima del 66% en células SK-BR-3. Sin embargo, este efecto podría vencerse por HRG exógena.

#### Humanización

- [0155]** El anticuerpo monoclonal murino 4D5 se humanizó usando una novedosa estrategia de "mutagénesis

por conversión génica” como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.821.337, cuya entera divulgación se incorpora expresamente por este documento por referencia. El anticuerpo monoclonal humanizado 4D5 usado en los siguientes experimentos es la variante de anticuerpo designada hu4D5-8 en esa patente. Hu4D5-8 comprende un dominio variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) (SEQ ID NO: 1) y un dominio variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) (SEQ ID NO: 2). Dentro del dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:1 hay tres regiones hipervariables: V<sub>L</sub>-región hipervariable 1, que comprende los aminoácidos RASQDVNTAVA (SEQ ID NO: 19); V<sub>L</sub>-región hipervariable 2 que comprende los aminoácidos SASFLYS (SEQ ID NO: 20); y V<sub>L</sub>-región hipervariable 3 que comprende los aminoácidos QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 21). Similarmente, hay tres regiones hipervariables dentro del dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 2: V<sub>H</sub>-región hipervariable 1 que comprende los aminoácidos GFNIKDTYIH (SEQ ID NO: 22), V<sub>H</sub>-región hipervariable 2 que comprende los aminoácidos RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 23); y V<sub>H</sub>-región hipervariable 3 que comprende los aminoácidos WGGDGFYAMDY (SEQ ID NO: 24).

## **Ejemplo 2**

### **VARIANTES DE HU4D5-8**

**[0156]** El reconocimiento de un anticuerpo implica frecuentemente un subconjunto de residuos de la región hipervariable con contactos en el centro del sitio de combinación de antígeno (véase Schier y col., J Mol Biol 263(4):551-67 (1996)). Este es el caso en el que el reconocimiento del antígeno de tumor HER2 por el anticuerpo humanizado conocido como hu4D5. La expresión en fago permitió la exploración de la variabilidad global del sitio de unión, revelando posiciones en las que podrían hacerse más sustituciones para mejorar la afinidad. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas de hu4D5-8, junto con residuos de CDR, se muestran en las Figuras 1A y 1B, respectivamente.

**[0157]** La variabilidad de secuencias dentro del sitio de unión a HER2 de alta afinidad del anticuerpo hu4D5-8 se probó construyendo bibliotecas de fagos de Fab monovalentemente expresadas, seleccionando clones de unión a HER2 y secuenciando una gran muestra (50-70 clones) de cada conjunto de bibliotecas en un punto en el procedimiento de selección en el que se observó un alto nivel de diversidad global (hermanos mínimos, es decir, manifestación de clones idénticos).

### **Selección de residuos de CDR para sustituciones**

**[0158]** El diseño de las bibliotecas de fagos se centró en cuatro residuos clave de un estudio de barrido con alanina (Kelley, R. F. & O'Connell, M. P., Biochemistry 32(27):6828-35 (1993)). Estos incluyeron residuos de CDR tanto en los dominios variables de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) como en la cadena pesada (V<sub>H</sub>): H91(V<sub>L</sub>), R50(V<sub>H</sub>), W95(V<sub>H</sub>), y Y100a(V<sub>H</sub>) (Kelley, R. F. & O'Connell, M. P., Biochemistry 32(27):6828-35 (1993)). Para las sustituciones también se sustituyeron residuos expuestos a la superficie adicionales que estuvieron próximos a la superficie de separación V<sub>L</sub>:V<sub>H</sub>, próximos al centro del sitio de combinación de antígeno basándose en la inspección de la estructura cristalina de hu4D5-8 (Eigenbrot y col., J Mol Biol 229(4):969-95 (1993)). Los residuos conocidos por ser importantes para la conformación de la cadena principal, o estructura canónica (Chothia y col., Nature 342(6252):877-83 (1989)) fueron omitidos de las bibliotecas. Con el fin de lograr representación adecuada de todas las variantes, las posiciones elegidas como diana se dividieron en cinco bibliotecas, consistiendo cada una en una pequeña agrupación de posiciones de superficie, con no más de siete residuos elegidos como diana en cada una. Cada biblioteca, excepto una que eligió como diana cinco residuos en CDR-H3, permitió la variación de residuos de tanto V<sub>L</sub> como V<sub>H</sub> (Figura 2). Algunos residuos se representaron en más de una biblioteca con el fin de probar efectos del contexto y permitir la covariación con otras posiciones proximales.

### **Oligonucleótidos para su uso en mutagénesis dirigida a sitio**

**[0159]** Un total de 19 residuos de hu4D5-8 se aleatorizaron usando mutagénesis dirigida a sitio con codones NNS degenerados (N = A, G, T o C; S = G o C) que codificaban los 20 aminoácidos. La mutagénesis dirigida a sitio se llevó a cabo usando los siguientes desoxi oligonucleótidos: Lib1,1 GCC AGT CAG GAT GTG NNS ACT GCT GTA GCC TGG (SEQ ID NO: 3); Lib1,2 CT TAT TAC TGT CAG CAA NNS NNS ACT ACT CCT CCC ACG (SEQ ID NO: 4); Lib1,3 C CTG GAA TGG GTT GCA NNS ATT TAT CCT ACG AAT GG (SEQ ID NO: 5); Lib1,4 C TAT TAT TGT TCT AGA NNS GGA GGG GAC NNS TTC NNS GCT ATG GAC TAC TGG GG (SEQ ID NO: 6); Lib2,1 CCG AAA CTA CTG ATT NNS TCG GCA TCC NNS CTC TAC TCT GGA GTC (SEQ ID NO: 7); Lib2,2 C GCA ACT TAT TAC TGT CAG CAA NNS TAT ACT ACT CCT CCC (SEQ ID NO: 8); Lib2,3 GT TCT AGA TGG GGA GGG NNS NNS NNS NNS GCT ATG GAC TAC TGG G (SEQ ID NO: 9); Lib3,1 C AAC ATT AAA GAC ACC NNS ATA CAC TGG GTG CGT C (SEQ ID NO: 10); Lib3,2 G GGC CTG GAA TGG GTT GCA NNS ATT TAT CCT ACG AAT GGT NNS ACT NNS TAT GCC GAT AGC G (SEQ ID NO: 11); Lib3,3 C TAT TAT TGT TCT AGA NNS GGA GGG GAC GGC TTC (SEQ ID NO: 12); Lib3,4 CAG CAA CAT TAT ACT NNS CCT CCC ACG TTC GGA CA (SEQ ID NO: 13); Lib4,1 G CGT GCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TGT TCT AGA TGG NNS NNS NNS NNS TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GG (SEQ ID NO: 14); Lib5,1 CCG AAA CTA CTG ATT NNS TCG GCA TCC NNS CTC NNS TCT GGA GTC CCT TCT CGC (SEQ ID NO: 15); Lib5,2 GG GGA GGG GAC GGC NNS TAT GCT ATG GAC

NNS TGG GGT CAA GGA ACC (SEQ ID NO: 16).

**[0160]** Los oligonucleótidos usados para secuenciar el fago seleccionado fueron TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCG TTT AGG TGT TTT CAC GAG CAC T (SEQ ID NO: 17) y CAG GAA ACA GCT ATG ACC GTT CCA CGA CAC CGT CAC CGG TTC (SEQ ID NO: 18).

#### 5 Construcción de bibliotecas de fagos de hu4D5-8

**[0161]** El fagémido de hu4D5-8 (564/11) se preparó fusionando las cadenas ligeras y pesadas de Fab (Kelley y col., *Biochemistry* 31(24):5434-41 (1992)) con una forma truncada de g3, que codifica una de las proteínas de la envoltura del fago M13.

**[0162]** Las bibliotecas hu4D5 se construyeron como se ha descrito en procedimientos previos (Sidhu y col., *Methods Enzymol* 328: 333-63 (2000a); Lowman, H. B., *Methods Mol Biol* 87:249-64 (1998)). Para cada biblioteca, el molde fue una versión modificada del fagémido 564/11 que contenía codones de terminación (TAA) introducidos en las posiciones en las que los aminoácidos iban a mutarse. Se preparó un molde de terminación diferente para cada biblioteca. Los moldes de terminación y oligonucleótidos mutagénicos descritos en la sección previa se usaron en mutagénesis de Kunkel convencional (Kunkel y col., *Methods Enzymol* 204:125-39 (1991)). La hibridación de oligonucleótidos mutagénicos para el molde de terminación reparó el codón de terminación e introdujo las mutaciones deseadas. Todas las bibliotecas fueron del orden de  $10^{10}$ , más allá de las diversidades teóricas por 10 a 1000 veces. Esto garantizó que al menos una copia de todas las mutaciones estaba presente en cada biblioteca.

#### Clasificación de bibliotecas de fagos de hu4D5-8

**[0163]** Los fagos se amplificaron en *E. coli* y se sometieron a rondas cada vez más rigurosas de selección de unión a antígeno usando concentraciones decrecientes de HER2-ECD, empezando a 10 nM y disminuyendo 10 veces en cada ronda.

**[0164]** Las bibliotecas de fagos se seleccionaron por su capacidad para unirse al receptor de HER2 usando una estrategia similar a la previamente descrita (Hawkins y col., *J Mol Biol* 226(3):889-96 (1992)). Los fagos de la biblioteca que se unió a antígeno HER2-ECD biotinilado se capturaron con perlas magnéticas que habían sido bloqueadas con proteína de la leche durante 1 hora a 37°C. Una preincubación de fago con perlas durante 1 hora a 37°C minimizó la unión no específica del fago seleccionado en cada ronda. Las perlas unidas a complejos de HER2-fago se separaron y se lavaron cinco veces durante la ronda 1, y 10 veces para todas las rondas posteriores de clasificación. Los fagos se eluyeron de las perlas y se neutralizaron con HCl. Una parte del fago eluido se propagó en células XL-1 rápidamente divisoras (Stratagene, La Jolla, CA) o SS320 (Sidhu y col., *Methods Enzymol* 328: 333-63 (2000b)) en presencia de M13-VCS (Stratagene). El tamaño de la biblioteca se determinó sembrando diluciones seriadas de células sobre agar. El enriquecimiento de bibliotecas se determinó comparando el número de fagos aislados en presencia y ausencia de antígeno. Los fagos se trataron de otro modo idénticamente con respecto a la pre-incubación, separación por perlas magnéticas y etapas de lavado.

**[0165]** En la ronda de selección inicial,  $1 \times 10^{13}$  fagos de biblioteca se incubaron con antígeno 10 nM. Entonces, la concentración de antígeno se disminuyó 10 veces durante cada ronda posterior de cribado. Los sobrenadantes de fago de clones individuales se ensayaron para la actividad en un ELISA de fago (Lowman, H. B., *Methods Mol Biol* 87:249-64 (1998)) y mostraron que más del 50% fueron positivos después de la segunda ronda de selección. Todas las bibliotecas expresaron enriquecimiento por la ronda 4, con selección usando antígeno 0,01 nM.

#### Secuenciación y análisis de ADN de fago

**[0166]** Los fagos se secuenciaron directamente a partir de sobrenadantes de cultivo de células. Una reacción de PCR convencional del fago amplificó la cadena ligera y pesada del Fab. La secuencia del cebador universal M13 directo e inverso se incluyó en los cebadores de PCR de manera que el producto pudiera ser fácilmente secuenciado con cebadores convencionales. Las secuencias obtenidas se analizaron primero en el programa SGcount como se ha descrito previamente (Weiss y col., *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16), 8950-4 (2000)). Los clones con dudas de secuencia se sacaron del análisis. Entonces, las secuencias restantes se filtraron (1) quitando hermanos, (2) normalizando para cualquier sesgo de codones que resultara del uso de un codón NNS, y (3) normalizando para el número total de secuencias, de manera que los resultados de diferentes bibliotecas pudieran compararse directamente. El número de clones analizados para cada biblioteca fue del siguiente modo: 71 de la biblioteca-1, 82 de la biblioteca-2, 71 de la biblioteca-3, 74 de la biblioteca-4 y 57 de la biblioteca-5.

#### 50 Análisis de variabilidad dentro del sitio de unión de hu4D5-8

**[0167]** Con el fin de mapear la variabilidad de secuencias dentro del sitio de unión de hu4D5-8, sistemáticamente se calculó el coeficiente de variabilidad de Wu-Kabat de los datos de secuencias. La variabilidad

( $V_s$ ) es el número de aminoácidos diferentes en una posición dada dividida por la frecuencia del aminoácido más común en esa posición (Wu, T. T. & Kabat, E. A., *J Exp Med* 132(2), 211-50 (1970)).

**[0168]** Los clones de cada biblioteca se secuenciaron después de 4 rondas de selección de HER2-ECD. Los datos de secuencias se normalizaron para ajustarlos para codones que se representaron más de una vez. En la mayoría de las bibliotecas hubo algunos hermanos (clones con secuencia de ADN idéntica). Sin embargo, la biblioteca-4 fue dominada por una única secuencia con sólo 7 secuencias únicas totales, y como todos, excepto dos residuos en la biblioteca-4, se mutaron en cualquier parte, se omitió del análisis adicional. También se omitió cualquier hermano en el resto de las bibliotecas en el análisis de variabilidad de aminoácidos.

**[0169]** Usando esta medida, la variabilidad de aminoácidos seleccionados por fago podría compararse con la variabilidad natural de aproximadamente 2000 cadenas ligeras  $\kappa$  de Ig humana y 4500 cadenas pesadas de Ig humana encontradas en la base de datos de Kabat (Johnson, G. & Wu, T. T., *Nucleic Acids Res* 29(1):205-6 (2001)). Los resultados (Figura 5) mostraron variabilidad extremadamente reducida en los residuos de hu4D5-8 en comparación con la variabilidad de un amplio intervalo de anticuerpos en la base de datos de Kabat. Sin embargo, dentro del sitio de unión a hu4D5-8, hay claramente diferencias en la variabilidad de los residuos aquí examinados. Estas posiciones se clasificaron según su puntuación de variabilidad: clase 1, residuos relativamente invariantes ( $V_s < 10$ ); clase 2, residuos moderadamente variables ( $V_s = 10$  a 40); y clase 3, residuos altamente variables ( $V_s > 40$ ). La información de secuencias para los clones seleccionados de las cuatro bibliotecas se muestra en la Figura 3, presentada según este sistema de clasificación. Todos los aminoácidos se observaron a alguna frecuencia y posición, pero Cys y Gln fueron sólo raramente observados (2-3% en dos posiciones cada uno). También se estudió la relación entre los patrones de variabilidad y los efectos de sustituciones sobre la afinidad de unión.

**[0170]** En general, los residuos naturales se conservaron fuertemente en muchas posiciones. Los residuos de la cadena pesada Y33, R50, Y56, R58, W95, G99, F100 y Y100a, junto con los residuos de la cadena ligera F53 y T94, se conservaron todos con frecuencias normalizadas  $\geq 45\%$  (Figura 3). Y100a( $V_H$ ), un efecto  $>12.000$  veces cuando se mutó a Ala (Kelley, R. F. & O'Connell, M. P., *Biochemistry* 32(27):6828-35 (1993)), R50( $V_H$ ), un efecto  $>2000$  veces cuando se mutó a Ala y G99( $V_H$ ), no previamente mutado, se conservaron aproximadamente el 90-100% - los dos últimos en dos bibliotecas independientes. Por otra parte, algunos de los residuos que aparecieron en múltiples bibliotecas mostraron diferencias dependientes del contexto en apariciones de aminoácidos. W95( $V_H$ ), un éxito de Ala  $>18.000$  veces, mostró residuo natural como el residuo preferido con 82% de frecuencia en una biblioteca (biblioteca 2), pero con sólo el 59% en otra (biblioteca 1). F100( $V_H$ ), un modesto éxito de Ala de 7 veces, se conservó bastante fuertemente en una biblioteca (biblioteca 3), pero se sustituyó aproximadamente igual de frecuentemente con Trp o Met en otra (biblioteca 5). F53 ( $V_L$ ) es otro ejemplo de cómo algunos residuos seleccionados variaron con el contexto. En la biblioteca 3, la Phe natural se prefirió del 67% al 16% con respecto al Trp, mientras que en la biblioteca 5, la preferencia se invirtió con Trp a favor con respecto a Phe por 55% al 16% (Figura 3).

**[0171]** Los residuos naturales no fueron tan predominantes en otras posiciones. De forma interesante, en T94( $V_L$ ), cuando la sustitución de Ala tuvo poco efecto, hubo una conservación del 45% de Thr, pero también una manifestación bastante alta (27%) de una sustitución químicamente distinta, Trp. Varios residuos de la cadena ligera que habían mostrado un intervalo de efectos del barrido con Ala de 6 veces a 200 veces también mostraron una fuerte selección ( $\geq 45\%$  de frecuencia) de residuos no naturales, pero preservaron el carácter químico natural: N30( $V_L$ ), Y55( $V_L$ ), H91( $V_L$ ) en dos bibliotecas, y Y92( $V_L$ ). En  $V_L30$ , la Asn natural se produjo en sólo el 34% de los clones seleccionados y se sustituyó con Ser en el 53% de los clones seleccionados. De forma interesante, en  $V_L92$  vecino, el Trp se produjo en el 41% de los clones seleccionados, mientras que la Met, Phe y Tyr (natural) se produjeron cada uno en el 16-19% de los clones. Tyr en  $V_L55$  se sustituyó preferentemente con Trp (58%) y menos frecuentemente con Phe o Tyr (12% cada uno). Debido a que estos tipos de sustitución tuvieron en general efectos impredecibles sobre la afinidad de unión, se examinaron adicionalmente (véase más adelante) como mutaciones puntuales en el contexto de preparaciones del Fab hu4D5-8 soluble.

**[0172]** En las tres posiciones restantes, Y49( $V_L$ ), D98( $V_H$ ) y Y102( $V_H$ ), el patrón de sustituciones fue más complejo, con ningún aminoácido individual que se produjera con más de aproximadamente el 30% de frecuencia. Estos residuos retuvieron la identidad WT con frecuencia  $<10\%$  y tuvieron la mayor variedad de aminoácidos. Y49( $V_L$ ) (junto con Y55( $V_L$ )) frente a  $V_H100$  y  $V_H102$  en la superficie de separación de la cadena ligera:cadena pesada.  $V_H49$  se conservó escasamente (sólo 9% de WT) en dos bibliotecas y mostró una preferencia por Trp o Phe, dependiendo del contexto. Tyr en  $V_H102$  fue una cadena lateral de la CDR murina que se añadió durante la humanización (Carter y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 89(10):4285-9 (1992b)) para mejorar la afinidad de unión; sin embargo, la mutación puntual en el aislamiento no afectó la afinidad (Kelley, R. F. & O'Connell, M. P., *Biochemistry* 32(27):6828-35 (1993)). De los datos de la biblioteca de fagos, el residuo de la región estructural humana, Val, se prefirió en realidad en esta posición. Tanto Val como Tyr se producen frecuentemente en cadenas pesadas de Ig humana en esta localización (Johnson, G. & Wu, T. T., *Nucleic Acids Res* 29(1):205-6 (2001)). Un residuo vecino,  $V_L55$ , se conservó escasamente (mencionado anteriormente). El residuo más escasamente conservado fue  $V_H98$ .

D98(V<sub>H</sub>) se localiza en la punta del extremo 3 variable de la cadena pesada. Se mutó en el 98% de todos los clones seleccionados y aquí se observó la sustitución de cada aminoácido, excepto Cys. El aminoácido más frecuente en esta posición fue Trp, que se produce con 23% de frecuencia. Estas sustituciones también fueron de particular interés, y se examinan adicionalmente (véase más adelante) como mutaciones puntuales en el contexto de preparaciones del Fab hu4D5-8 soluble.

#### Comparación de variabilidad de secuencias y datos de barrido con Ala

**[0173]** Un barrido con alanina sustituye residuos WT con alanina y generalmente mide la pérdida de función. Un objetivo de las bibliotecas de fagos usadas en estos experimentos fue mantener la función mediante sustituciones al azar y selección de unión a antígeno. Se compararon el grado de variación de secuencias usando el parámetro  $V_S$  (Figura 5) con el mapeo por barrido con Ala (Kelley, R. F. & O'Connell, M. P., *Biochemistry* 32(27):6828-35 (1993)) de hu4D5-8 en el contexto de la estructura cristalina del anticuerpo (Figura 7). Los dos mapas mostraron algunas características comunes y algunas distintas.

**[0174]** Se ha encontrado que cuatro residuos de hu4D5-8 son los más críticos para la unión a antígeno en el sitio de unión de HER2-ECD basándose en mutagénesis con alanina (Kelley, R. F. & O'Connell, M. P., *Biochemistry* 32(27):6828-35 (1993)). La importancia de tres de estos residuos (véase la Figura 7), R50(V<sub>H</sub>), W95(V<sub>H</sub>) y Y100a(V<sub>H</sub>), se confirmó porque se seleccionaron coherentemente como su identidad WT a pesar del contexto en el que se aleatorizaron. Sin embargo, la expresión en fago también seleccionó cuatro residuos adicionales (N30(V<sub>L</sub>), R56(V<sub>H</sub>), R58(V<sub>H</sub>) y G99(V<sub>H</sub>)) que son altamente conservados como WT que no se detectaron por barrido con alanina (Figura 7). Se encontró que dos de estos, N30(V<sub>L</sub>) y R56(V<sub>H</sub>), redujeron  $K_D$  4 a 6 veces cuando se mutaron a alanina.

**[0175]** Una discrepancia entre los resultados del barrido con alanina y la expresión en fago fue V<sub>L</sub>91. Cuando V<sub>L</sub>91 se mutó a alanina hubo una disminución de 200 veces en la unión. V<sub>L</sub>91 se mutó a una Phe en el 44 - 45% de todos los clones seleccionados en dos bibliotecas diferentes. hu4D5-8 WT tiene una His en esta posición. Aunque esta His sólo tiene el 22% del área superficial expuesta en la estructura cristalina, todavía hubo espacio para ajustar una Phe (Eigenbrot y col., *J Mol Biol* 229(4):969-95 (1993)). El anillo aromático adicional podría empaquetarse contra residuos próximos y extender el núcleo hidrófobo.

**[0176]** La Ala se produjo en sólo 6 (V<sub>L</sub>49, V<sub>L</sub>53, V<sub>L</sub>55, V<sub>H</sub>98, V<sub>H</sub>99, V<sub>H</sub>102) de los 19 residuos que se aleatorizaron y a una frecuencia de <6% para cinco de estos residuos, 14% para los otros (V<sub>H</sub>99). Cuatro de estos seis residuos se incluyeron en el barrido con alanina y se mostró que cuatro de ellos redujeron  $K_D$  2 veces (Kelley y col., *Biochemistry* 31(24):5434-41 (1992)). La falta de selección con alanina en estas posiciones estuvo de acuerdo con estos resultados, a condición de que la selección por unión a HER2 en las condiciones aquí empleadas era generalmente eficaz en eliminar variantes con >2 veces de reducciones en la afinidad de unión. El análisis de afinidades de unión a Fab de sustituciones prevalentes soportó esto (Figuras 2 y 3) debido a que todas las variantes de alta frecuencia (>50%) mostraron afinidades de unión dentro de 2 veces de las naturales. A diferencia, una sustitución de baja frecuencia (10%), Y100aF(V<sub>H</sub>), demostró afinidad de unión aproximadamente 5 veces más débil que la de hu4D5-8 (Figura 4).

**[0177]** La selección de bibliotecas de fagos se pensó para seleccionar mutantes con alta afinidad por antígeno. La conservación de cadenas laterales particulares podría ser el resultado de contacto de antígeno directo, requisitos para la estabilidad o expresión estructural de anticuerpo, o una combinación de estos efectos. Un ejemplo de una probable conservación estabilizadora de la estructura fue en G99(V<sub>H</sub>). V<sub>H</sub>99 fue un residuo altamente conservado en el bucle 3 variable de la cadena pesada. Este residuo en la posición  $i + 2$  del bucle es un giro  $\beta$  tipo II que es más comúnmente una Gly (Wilmot, C. M. & Thornton, J. M., *J Mol Biol* 203(1), 221-32 (1988)). Por tanto, pareció probable que fuera un residuo estabilizador de la estructura.

#### Características químicas de sustituciones observadas

**[0178]** Cadenas laterales alifáticas no fueron específicamente elegidas como diana en las bibliotecas aquí examinadas. Quizás no sorprendentemente, sustituciones hidrófobas fracasaron en dominar en cualquier sitio dado. Sin embargo, hubo un gran número de residuos hidrófobos que aparecieron a bajos niveles en los clones mutados. De estos, la mayor manifestación fue sólo el 23% para Leu sustituida en R58(V<sub>H</sub>).

**[0179]** Dos cadenas laterales polares se conservaron bien: R50(V<sub>H</sub>) y R59(V<sub>H</sub>). Sin embargo, H91(V<sub>L</sub>) y D98(V<sub>H</sub>) estuvieron más frecuentemente sustituidas con un residuo aromático no polar, y T94(V<sub>L</sub>) estuvo algunas veces sustituido con Trp. D98W(V<sub>H</sub>) fue particularmente interesante debido a que mejoró la unión a antígeno como se trata más adelante.

**[0180]** La conservación del carácter químico se produjo especialmente entre residuos aromáticos e hidrófobos en las bibliotecas hu4D5-8. Hay 6 residuos (V<sub>H</sub>100a, V<sub>H</sub>56, V<sub>L</sub>53, V<sub>H</sub>33, V<sub>H</sub>95 y V<sub>L</sub>55) que favorecieron uno

aromático en el 80% o más de los clones seleccionados. Cinco posiciones (V<sub>L</sub>49, V<sub>L</sub>53, V<sub>L</sub>91, V<sub>L</sub>92, V<sub>H</sub>100) seleccionaron aromáticos el 50% o más de las veces. Mientras que hubo más frecuentemente algún sesgo hacia un, en un caso, V<sub>H</sub>100, una Phe y un Trp se produjeron igual de frecuentemente (30% o 34%).

**[0181]** Tres residuos altamente conservados participaron probablemente en una interacción catión- $\pi$ . Esta interacción fue entre una Arg (V<sub>H</sub>50), una Tyr (V<sub>H</sub>33) y un Trp (V<sub>H</sub>95) (Gallivan, J. P. & Dougherty, D. A., Proc Natl Acad Sci U S A 96(17):9459-64 (1999)). Cuando se mutó en una biblioteca, la Arg se produjo en V<sub>H</sub>50 en el 93% de los clones. Trp V<sub>H</sub>95 se seleccionó en el 59% de los clones y Tyr V<sub>H</sub>33 en el 61% de los clones seleccionados. Otras sustituciones de aminoácidos en V<sub>H</sub>95 y V<sub>H</sub>33 fueron con otros residuos hidrófobos como Phe o Tyr (V<sub>H</sub>95) y Trp (V<sub>H</sub>33). Estas mutaciones fueron todas probablemente para preservar la química estabilizadora con Arg V<sub>H</sub>50. Este resultado fue soportado por el hecho de que dos de estos residuos, V<sub>H</sub>50 y V<sub>H</sub>95, aumentaron drásticamente  $\Delta\Delta G$  cuando se mutaron a alanina (Kelley, R. F. & O'Connell, M. P., Biochemistry 32(27):6828-35 (1993)).

**[0182]** También se conservaron otros aromáticos. Sobre la superficie del sitio de unión a hu4D5-8, éstos rodearon una región de residuos altamente conservados (Figura 7). Varias de estas mutaciones implicaron un conjunto de interacciones  $\pi$ - $\pi$  putativas. Un ejemplo fue en las posiciones V<sub>L</sub>53, V<sub>L</sub>49 y V<sub>H</sub>100. En hu4D5-8, estos fueron una fenilalanina, una tirosina y una fenilalanina, respectivamente. La estructura de hu4D5-8 ilustró que estos residuos estuvieron dentro de 5Å entre sí y apilaron los anillos aromáticos cara a cara o en la conformación con forma de T preferida típica de una interacción  $\pi$ - $\pi$  (Burley, S. K. & Petsko, G. A., Science 229(4708):23-8 (1985)). En el contexto de la biblioteca 3, las fenilalaninas externas se conservaron, mientras que la Tyr en el centro prefirió Phe en el 28% de los clones seleccionados. En una biblioteca diferente, la de la biblioteca 5, los tres residuos se alteraron. En V<sub>L</sub>49, el 31% de los clones tuvieron un Trp, mientras que el 55% tuvieron un Trp en V<sub>L</sub>53 y el 64% tuvieron tanto Trp como Phe en V<sub>L</sub>100. El hecho de que estas posiciones prefirieran aminoácidos aromáticos en ambas de las bibliotecas en las que se mutagenizaron sugirieron que la conservación de la interacción  $\pi$ - $\pi$  estabilizante sobre la superficie de hu4D5-8 fue importante para la estructura del anticuerpo. También puede haber contribuido a contactos de unión a antígeno.

**[0183]** Otra interacción  $\pi$ - $\pi$  que parece que se produjo entre dos tirosinas (V<sub>L</sub>55 y V<sub>H</sub>102) se localizó en la superficie de separación entre la cadena ligera y pesada. Estas tirosinas estuvieron en una geometría con forma de T y podrían ser una fuente de estabilización. Sorprendentemente, esta interacción se perdió en los clones seleccionados. El treinta y cinco por ciento de los clones sustituyeron V<sub>L</sub>55 con Trp mientras que V<sub>H</sub>102 tuvo una manifestación del 19% de valina. Casi cualquier otro aminoácido podría producirse en V<sub>H</sub>102, pero la valina se prefirió ligeramente.

#### Efectos no aditivos sobre la energía libre de unión

**[0184]** Las bibliotecas de fagos de hu4D5-8 distribuyeron 19 residuos de superficie entre las 5 bibliotecas. Varios residuos estuvieron presentes en más de una biblioteca para permitir que aquellos co-variaran en proximidad. De los residuos representados en bibliotecas por duplicado, algunas diferencias se observaron basándose en el contexto como se observa anteriormente. Sin embargo, basándose en un análisis estadístico de covariación, no hubo correlaciones por pares significativas de sustituciones en ninguna de estas posiciones, aunque un número mucho mayor de secuencias podría hacer estas correlaciones más evidentes.

**[0185]** Aunque la mayoría de los mutantes de Fab tuvieron efectos ligeramente negativos sobre  $K_D$ , la combinación de todas las mutaciones puntuales probadas en los múltiples mutantes M.7 todavía dio una afinidad de unión mejorada. Varias mutaciones puntuales individuales fueron claramente no aditivas en hu4D5-8 como mutaciones tales como Y100aF(V<sub>H</sub>) y Y92W(V<sub>L</sub>) que afectaron adversamente la estabilidad de unión y/o plegamiento fueron "rescatados" por combinaciones con otras mutaciones a un mayor grado que el que se predeciría por principios de aditividad (Wells, J. A., Biochemistry 29(37), 8509-17 (1990)).

#### Ejemplo 3

##### 45 CONSTRUCCIONES DE Fab DE VARIANTES DE Hu4D5-8

**[0186]** Los ensayos tratados en el Ejemplo 2 anterior demostraron cualitativamente que todos los clones probados retuvieron alta afinidad (nanomolar a sub-nanomolar) de unión a antígeno. Además de aquellos ensayos, también se probó la afinidad de unión de fragmentos Fab solubles.

#### Selección de clones para experimentos de unión a Fab

**[0187]** Se seleccionaron ocho clones usando mutaciones puntuales en el contexto de fragmentos Fab solubles, que representan alta frecuencia de manifestación de residuos no naturales y un intervalo de puntuaciones de variabilidad y se probaron para determinar cómo las sustituciones seleccionadas afectaron la unión de HER2 en comparación con el Fab hu4D5-8.

**[0188]** Aunque no se usaron datos de hermanos en el análisis de la variedad de mutaciones en sitios individuales, estos datos se consideraron en el diseño de variantes para experimentos de unión. Se razonó que si un único clon estaba presente en múltiples copias después de varias rondas de selección podría ser posiblemente debido a mejoras en la unión, estabilidad o expresión. Se eligieron tres de los hermanos más abundantes: un mutante triple, llamado M.3 (N30(V<sub>L</sub>)S + H91(V<sub>L</sub>)F + Y92(V<sub>L</sub>)W) y los mutantes individuales T94(V<sub>L</sub>)S y Y100a(V<sub>H</sub>)F. Estos clones representaron aproximadamente el 20% del número total de clones secuenciados. Todas las mutaciones individuales también se combinaron en un clon de mutantes múltiples, M.7, (N30(V<sub>L</sub>)S + H91(V<sub>L</sub>)F + Y92(V<sub>L</sub>)W + T94(V<sub>L</sub>)S + D98(V<sub>H</sub>)W + Y100a(V<sub>H</sub>)F + Y102(V<sub>H</sub>)V).

#### Construcciones y purificación de Fab

10 **[0189]** Se introdujeron mutaciones con mutagénesis QuikChange<sup>®</sup> (Stratagene, La Jolla, CA) en plásmidos de expresión de Fab pAK19 descritos previamente (Carter y col., Proc Natl Acad Sci U S A 89(10):4285-9 (1992b)). Mutantes de Fab de hu4D5-8 se expresaron en exceso por secreción en *E. coli* (Carter y col., Biotechnology (N Y) 10(2):163-7 (1992a)) y se purificaron usando una columna de afinidad de proteína G (Kelley y col., Biochemistry 31(24):5434-41 (1992)). La concentración de cada mutante se determinó espectrofotométricamente, además de por análisis cuantitativo de aminoácidos; los dos procedimientos concordaron dentro del 5-12%.

#### Mediciones de afinidad de unión por resonancia de plasmones superficiales (SPR)

**[0190]** Se usó resonancia de plasmones superficiales (SPR) para medir la unión cinética de Fab expresados en exceso a receptor de HER2-ECD inmovilizado. Se usó un sistema de análisis de interacción cinética en tiempo real BIAcore-2000 o BIAcore-3000 (Biacore Inc., Piscataway, NJ) para determinar las constantes de asociación ( $k_{as}$ ) y disociación ( $k_{dis}$ ) (Karlsson y col., J Immunol Methods 145(1-2):229-40 (1991)) de los mutantes de Fab de hu4D5-8. Un chip de biosensor B1 (Biacore, Inc.) se activó según las instrucciones del fabricante y se inmovilizó con 86 a 500 UR (unidades de respuesta) de HER2-ECD en acetato sódico 10 mM, pH 4,8. Los grupos sin reaccionar se bloquearon con etanolamina 1 M. La cinética de mutantes de hu4D5-8 que se unen a HER2-ECD inmovilizado se midieron con diluciones seriadas dobles empezando con Fab 100 nM en tampón de electroforesis (PBS, 0,05% de Tween, 0,01% de azida de sodio) a una velocidad de flujo de 20  $\mu$ l/min. Se registraron las mediciones de unión a 19°C, 25°C, 31°C y 37°C a 4 densidades diferentes de HER2-ECD inmovilizado. Los datos se ajustaron a un modelo de unión de Langmuir 1:1 usando el software de evaluación BIAcore versión 3 que calculó las constantes de asociación ( $k_{as}$ ) y disociación ( $k_{dis}$ ). Una constante de equilibrio,  $K_D$ , se calculó a partir de  $k_{dis}/k_{as}$ . Las diferencias en la energía libre, en comparación con hu4D5-8 natural se calcularon como se ha descrito (Wells, J. A., Biochemistry 29(37), 8509-17 (1990)):  $\Delta\Delta G = -RT \ln (K_D^{(mutante)} / K_D^{(natural)})$ .

#### Afinidades de unión a antígeno de variantes de Fab

**[0191]** Los datos cinéticos para Fab mutantes que se unen a HER2-ECD a temperatura fisiológica (37°C) se muestran en la Figura 4. Los mutantes de Fab generalmente tuvieron constantes de velocidades de asociación y disociación,  $k_{as}$  y  $k_{dis}$ , muy similares. Como resultado, la mayoría de los mutantes tuvieron  $K_D$  similares al Fab de hu4D5-8. Un mutante, Y100a(V<sub>H</sub>)F, tuvo un efecto 4 veces negativo sobre  $K_D$ . Dos mutantes tuvieron  $K_D$  mejoradas, el multi-mutante M.7, (N30(V<sub>L</sub>)S + H91(V<sub>L</sub>)F + Y92(V<sub>L</sub>)W + T94(V<sub>L</sub>)S + D98(V<sub>H</sub>)W + Y100a(V<sub>H</sub>)F + Y102(V<sub>H</sub>)V), 1,5 veces y el mutante individual D98(V<sub>H</sub>)W aproximadamente 3 veces a 37°C (Figura 4).

**[0192]** Durante un intervalo de temperatura de 19°- 37°C, todas las variantes probadas mostraron las energías de unión perfectamente dentro de 1,0 kcal/mol de la de para la unión de hu4D5-8 natural a HER2 (Figura 6). Durante el mismo intervalo, la afinidad de hu4D5-8 fue esencialmente constante, con  $K_D$  que oscila de 0,13 a 0,33 nM.

**[0193]** Las constantes de unión para Y92(V<sub>L</sub>)W mutante no fueron informadas debido a que se expresó 10 veces más escasamente que cualquiera de los otros Fab y mostró escasa unión a HER2. Aunque se seleccionaron por fago, estos resultados indican que Y92(V<sub>L</sub>)W fue incapaz de funcionar en la referencia de hu4D5-8 natural. De forma interesante, esta mutación fue "rescatada" en el contexto de cualquiera de los múltiples mutantes, M.3 o M.7. La fusión con la proteína g3 puede ayudar en el plegamiento, como se observa para ciertos mutantes expresados en fago de IGF-1 que se comportaron malamente como proteínas solubles (Dubaque, Y. & Lowman, H. B., Biochemistry 38(20):6386-96 (1999)).

#### Identificación de una variante mejorada por afinidad

**[0194]** Se ha informado que la afinidad de unión de hu4D5-8 Fab está en el intervalo sub-nanomolar (Kelley, R. F. & O'Connell, M. P., Biochemistry 32(27):6828-35 (1993)). Se seleccionó un único mutante, D98(V<sub>H</sub>)W, como que tenía una mejora de 3 veces con respecto a WT. D98(V<sub>H</sub>) se localiza en la punta del bucle 3 variable de la cadena pesada y es el residuo más protuberante sobre la superficie del anticuerpo (Eigenbrot y col., J Mol Biol 229(4):969-95 (1993)). Además, es adyacente a W95(V<sub>H</sub>), uno de los cuatro éxitos fuertes en el barrido con alanina. D98(V<sub>H</sub>) es la posición más variable de los 19 residuos aleatorizados. Trp no domina el conjunto seleccionado, pero

es la sustitución más frecuente seleccionada. La localización de Trp V<sub>H</sub>98 sobre la superficie a continuación del sitio de unión putativo sugiere que esto podría ser un sitio de plasticidad de la secuencia que se pone directamente en contacto con el antígeno.

#### **Ejemplo 4**

#### **5 SELECCIÓN DE UNIÓN RIGUROSA POR CONSTANTE DE DISOCIACIÓN USANDO BIBLIOTECAS DE FAGOS DE Fab DE 4D5**

**[0195]** Para buscar variantes de alta afinidad adicionales de 4D5 humanizado, las cinco bibliotecas de variantes de 4D5 descritas en los ejemplos previos (véase, también Gerstner y col., J. Mol. Biol. 321, 851-862 (2002)) se usaron para unir selecciones con HER2 inmovilizado como diana de unión. Se diseñaron bibliotecas adicionales y se construyeron basándose en los resultados de selecciones usando las bibliotecas iniciales. En particular, las bibliotecas 6 y 7 se diseñaron para elegir como diana una combinación de residuos identificados en las bibliotecas iniciales con diversidad restringida usando codones degenerados seleccionados y para incluir diversidad en las posiciones proximales a aquellas identificadas anteriormente. La Tabla 2 resume la diversidad manipulada en estas bibliotecas.

15

**Tabla 2.**

Diseño de bibliotecas de 4D5 5 y 6.				
Biblioteca	Cadena	Posición	Codón	Residuos codificados
Biblioteca-6	VL	30	ARC	N, S
	VL	49	KKS	F, L, W, V(2), C, G(2)
	VL	53	TKS	W, F, L, C
	VL	55	TDS	W, L, F, C, Q*, Y
	VL	91	YWC	F, H, L, Y
	VL	92	TDS	W, L, F, C, Q*, Y
	VL	94	WCC	S, T
	VH	100	WKS	F, L, C, W, I, M
	VH	102	STC	L, V
Biblioteca-7	VL	27	NNK	(todos)
	VL	28	NNK	(todos)
	VL	30	ARC	N, S
	VL	31	NNK	(todos)
	VL	32	NNK	(todos)
	VL	66	NNK	(todos)
	VL	91	YWC	F, H, L, Y
	VL	92	TDS	W, L, F, C, Q*, Y

**[0196]** En la Tabla 2 anterior, las posiciones se muestran según el sistema de numeración de Kabat (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los codones degenerados se muestran usando el código de la IUPAC (R= A/G, Y= C/T, D= A/G/T, K= G/T, S=G/C, W= G/T, N= A/G/C/T).

5 **[0197]** En esta serie de experimentos de unión-selección, las bibliotecas de fagos de 4D5 se propagaron y se sometieron a clasificación esencialmente como se ha descrito (Lowman, Methods Mol. Biol. 87, 249-264 (1998); Chen y col., J. Mol. Biol. 293, 865-881 (1999)). Brevemente, placas inmunosorbentes (Nunc Maxisorp) se recubrieron con 2 µg/ml de HER2-ECD en PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se bloquearon con BSA (albúmina de suero bovino). Después se añadieron fagos a una concentración de aproximadamente 1011 fago/ml en  
10 PBS que contenía BSA y Tween-20.

**[0198]** Para selecciones rigurosas por constante de disociación se dejó que la unión del fago alcanzara el equilibrio durante un periodo de 16 horas o más, seguido de lavado con PBS/Tween-20 y disociación en tampón de lavado que contenía 0,01% de azida de sodio (con o sin anticuerpo rhuMAb 4D5) durante periodos de tiempo progresivamente más largos (Tabla 3). Los fagos se eluyeron con una breve incubación (10 min) con HCl 100 mM,  
15 se neutralizaron y se propagaron durante la noche en células XL1-Blue (Stratagene) como se ha descrito (Lowman, 1998, arriba).

**Tabla 3.**

Condiciones para las selecciones de unión por constante de disociación				
Ronda	Tiempo de unión	Lavados	Tiempo de disoc.	Tampón de disoc.
1	48 h	10 x	-	-
2	16 h	20 x	3 h	Tampón de lavado
3	16 h	10 x al día	48 h	Tampón de lavado + 4d5 100 nM
4	16 h	10 x al día	120 h	Tampón de lavado + 4d5 100 nM

20 **[0199]** Los enriquecimientos por unión se midieron por comparación de títulos de fagos recuperados de pocillos de HER2 frente a BSA. Los resultados durante rondas cada vez más rigurosas de la selección de unión mostraron enriquecimiento del fago de unión a HER2-ECD durante la unión de referencia para cada biblioteca, excepto la biblioteca 4 (datos no mostrados).

**[0200]** Los clones de fagos se aislaron después de cuatro rondas de selección por unión para la  
25 secuenciación y caracterización adicional. Las secuencias de estos clones se muestran en la Tabla 4, en comparación con el residuo natural (rhuMAb 4D5) en cada posición. Se aplicó una prueba estadística de significancia (Lowman & Wells, J. Mol. Biol. 234, 564-578 (1993)) para definir sustituciones favorecidas en cada posición cuando los residuos no naturales se observaron comúnmente (Tabla 4). Brevemente, la frecuencia observada (Pobs) de cada aminoácido se compara con la frecuencia esperada (al azar) determinada a partir del  
30 número de codones que pueden codificar ese aminoácido (Pesp), usando una degeneración de codones particular. La puntuación de significancia, S, se calcula como  $S = (Pobs - Pesp) / \sigma$  en la que  $\sigma$  es la desviación estándar de la distribución al azar teórica (Lowman & Pocillos, 1993, arriba).

**Tabla 4.**

Secuencias de cepas aisladas de fago de 4d5 después de cuatro rondas de selección de unión por constante de disociación usando HER2-ECD inmovilizado.

Biblioteca 1	VL	VH					
Posición:	94	33	50	56	58	95	
WT	T	Y	R	Y	R	W	
4d5.26	T	Y	R	<b>A</b>	R	W	
4d5.29	T	Y	R	Y	R	<b>Y</b>	
4d5.32	T	Y	R	Y	R	<b>Y</b>	
4d5.34	T	Y	R	Y	R	<b>Y</b>	
4d5.37	T					<b>Y</b>	
4d5.39	T					<b>Y</b>	
4d5.41	T	<b>W</b>	R	Y	R	<b>F</b>	
4d5.44	T					<b>F</b>	
4d5.45	T	Y	R	<b>A</b>	R	W	
4d5.35	T	<b>W</b>	R	<b>W</b>	<b>I</b>	<b>Y</b>	
4d5.36	T	<b>W</b>	R	<b>W</b>	<b>I</b>	<b>Y</b>	
4d5.27	T	Y	R	Y	R	<b>F</b>	
4d5.33	T	Y	R	Y	R	<b>W</b>	
4d5.30	T	Y	R	Y	R	<b>Y</b>	
4d5.43	T					<b>Y</b>	
4d5.38	T	Y	R	Y	R	<b>Y</b>	
4d5.42	T	<b>F</b>	R	Y	R	<b>W</b>	
Cambios consenso:						<b>Y</b>	
Puntuación de significancia:						<b>13</b>	
Biblioteca 2	VL			VH			
Posición:	30	91	92	50	95	99	100a
WT	N	H	Y	R	W	G	Y
4d5.1	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>W</b>				
4d5.10	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>W</b>	R	W	G	Y
4d5.12	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>W</b>	R	W	G	Y
4d5.7	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>W</b>				

## ES 2 401 428 T3

Secuencias de cepas aisladas de fago de 4d5 después de cuatro rondas de selección de unión por constante de disociación usando HER2-ECD inmovilizado.

4d5.3	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>W</b>		R	W	G	Y	
4d5.8	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>W</b>		R	W	G	Y	
4d5.11	<b>S</b>		<b>W</b>		R	W	G	Y	
4d5.9	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>F</b>		R	W	G	Y	
4d5.2	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>G</b>		R	W	G	Y	
4d5.4	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>		R	W	G	Y	
4d5.5	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>W</b>		R	W	G	Y	
4d5.6	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>W</b>		R	W	G	Y	
Cambios consenso:	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>W</b>						
Puntuación significancia:	de	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>14</b>					
Biblioteca 3		VL				VH			
Posición:	49	53	91		98	99	100	100a	
WT	Y	F	H		D	G	F	Y	
4d5.15	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>Y</b>		<b>H</b>	G	<b>M</b>	Y	
4d5.22	<b>W</b>	F	<b>Y</b>		<b>A</b>	G	<b>F</b>	<b>N</b>	
4d5.16	L	F	H		<b>R</b>	S	<b>Y</b>	Y	
4d5.24	<b>F</b>	F	<b>Y</b>		<b>A</b>	S	<b>L</b>	<b>F</b>	
4d5.21	<b>W</b>	V	<b>F</b>		<b>R</b>	G	<b>L</b>	Y	
4d5.23	<b>S</b>	<b>W</b>	<b>F</b>		<b>S</b>	G	F	Y	
4d5.18	<b>K</b>	F	<b>Y</b>		<b>T</b>	G	<b>A</b>		Y
4d5.19	Y	F	<b>F</b>		<b>K</b>	G	F	Y	
4d5.13	V	W	<b>Y</b>						
4d5.14	V	F	<b>F</b>						
4d5.17	<b>F</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>		<b>L</b>	G	<b>H</b>	Y	
4d5.20	<b>L</b>	V			<b>H</b>	L	<b>Y</b>	Y	
**	4d5.31	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>T</b>					
	4d5.28	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>W</b>			V		
Cambios consenso:	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>Y / F</b>		<b>básico</b>				
Puntuación significancia:	de	<b>5,5</b>	<b>5,5</b>	<b>8,9 / 5,7</b>	<b>3,0</b>				

# ES 2 401 428 T3

Secuencias de cepas aisladas de fago de 4d5 después de cuatro rondas de selección de unión por constante de disociación usando HER2-ECD inmovilizado.

## Biblioteca 5

Posición:	49	53	55	100	102
WT	Y	F	Y	F	Y
4d5.50	D	W	W	P	K
4d5.51	D	W	W	P	L
4d5.52	D	W	W	P	L
4d5.54	V	T	W	P	W
4d5.53	Y	F	W		
4d5.59	F	H	W	W	M
4d5.57	V	V	W	W	L
4d5.60	A	V	L	H	L
4d5.49	W	R	W		
4d5.55	W	Q	F	F	W
4d5.56	V	W	L	P	H
4d5.58	W	T	Y	F	Y
4d5.89	D	W	W		
4d5.92	D	W	W	P	K
4d5.93	D	W	W	P	L
4d5.94	D	W	W		
4d5.77	Y	F	W	P	K
4d5.86	F	M	W		
4d5.85	E	W	W		
4d5.96	R	W	V		
4d5.87	T	K	W		
4d5.91	R	A	W		
4d5.88	T	R	V		
4d5.90	V	K	S	M	A
4d5.95	S	V	W		
Cambios consenso:	D	W	W	P	
Puntuación significancia:	de 7,1	11	20	7,9	

## Biblioteca 6

VL

V

## ES 2 401 428 T3

Secuencias de cepas aisladas de fago de 4d5 después de cuatro rondas de selección de unión por constante de disociación usando HER2-ECD inmovilizado.

(restringida):	Posición	30	49	53	55	91	92	94	H 10 0	102
	WT	N	Y	F	Y	H	Y	T	F	Y
	4d5.63	N	V	W	W	H	Y	T		
	4d5.64								<b>L</b>	<b>S</b>
	4d5.65	N	<b>V</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	H	Y	T	<b>L</b>	<b>S</b>
	4d5.66	N	<b>V</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	H	Y	T		
	4d5.68	N	<b>V</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	H	Y	T		
	4d5.70	N	<b>V</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	H	Y	T	<b>L</b>	<b>S</b>
	4d5.61	N	<b>F</b>	<b>K</b>	<b>W</b>	H	Y	T	<b>L</b>	<b>T</b>
	4d5.71	N	<b>V</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	H	Y	T		
	4d5.67	N	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	H	Y	T	<b>M</b>	<b>G</b>
	4d5.69	N	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	H	Y	T	<b>M</b>	<b>G</b>
	4d5.62	N	<b>W</b>	<b>L</b>	<b>P</b>	H	Y	T	<b>M</b>	
	4d5.72	N	<b>L</b>	<b>M</b>	<b>G</b>	H	Y	T	<b>R</b>	<b>L</b>
Cambios consenso:			<b>V</b>	<b>W</b>	<b>W</b>					
Puntuación de significancia:			<b>6</b>	<b>2,3</b>	<b>4,2</b>					

Biblioteca 7		VL								VH	
(restringida):	Posición	27	28	30	31	32	66	91	92	100	102
	WT	Q	D	N	T	A	R	H	Y	F	Y
	4d5.73	<b>S</b>	<b>Q*</b>	S	<b>S</b>	G	R	H	<b>W</b>		
	4d5.76	<b>S</b>	<b>Q*</b>	S	<b>G</b>	G	R	H	<b>W</b>	<b>P</b>	<b>A</b>
	4d5.75	<b>R</b>	<b>Q*</b>	N	T	A	R	<b>F</b>	<b>F</b>		
	4d5.83	<b>A</b>	<b>Q*</b>	S	<b>A</b>	G	R	<b>Y</b>	<b>W</b>	<b>P</b>	<b>V</b>
	4d5.79	Q*	<b>G</b>	S	<b>S</b>	G	<b>A</b>	H	<b>W</b>		
	4d5.80	Q*	<b>G</b>	S	<b>S</b>	A	<b>N</b>	H	<b>W</b>	<b>P</b>	<b>K</b>
	4d5.78	Q	<b>R</b>	N	<b>S</b>	A	<b>R</b>	H	<b>F</b>		
	4d5.81	Q*	<b>G</b>	S	<b>S</b>	A	<b>M</b>	H	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>L</b>
	4d5.74	N	<b>P</b>	S	<b>Q</b>	A	T	H	<b>W</b>		
	4d5.84	S	<b>Q*</b>	S	<b>K</b>	A	S	Y	<b>L</b>	<b>P</b>	<b>L</b>

## ES 2 401 428 T3

Secuencias de cepas aisladas de fago de 4d5 después de cuatro rondas de selección de unión por constante de disociación usando HER2-ECD inmovilizado.

	4d5.82	F	N	A	C	V	H	Q*	P	L
Cambios consenso:		<b>Q</b>		<b>S</b>	<b>G</b>			<b>W</b>	P	
Puntuación de significancia:	de	<b>5,7</b>		<b>4,1</b>	<b>4,1</b>			<b>3,4</b>	<b>5,5</b>	

**[0201]** Se recuperaron clones no secuenciados de la ronda 4 de selecciones usando la biblioteca 4. En la tabla anterior, los residuos de Gln codificados por la ultralectura del codón de terminación ámbar (TAG) se indican por Q\*. Una mutación espontánea (VH Y102M) se identificó en un sitio no elegido como diana para la mutagénesis en las bibliotecas originales (\*\*). Se muestran residuos consenso para posiciones en las que residuos no naturales se produjeron con frecuencia significativa. Las selecciones de codones restringidas usadas en las bibliotecas 6-7 se describen en la Tabla 2. En la biblioteca 3, residuos "básicos" se refieren a una combinación de H, K y R. Los blancos indican secuencia incierta o indeterminada en la posición correspondiente. La aparición de residuos no naturales puede reflejar afinidad de unión, estabilidad y/o nivel de expresión mejorados para variantes que contienen aquellas sustituciones. Sin embargo, en estudios de maduración por afinidad previos, puntuaciones de significancia >2 han guardado frecuentemente relación con mejoras en la afinidad de unión (Lowman & Wells, 1993, arriba). Por tanto, basándose en las puntuaciones de significancia de las secuencias de la Tabla 4, las sustituciones que pueden mejorar la afinidad de unión de 4d5 por HER2 se enumeran en la Tabla 5. Estas sustituciones pueden compararse con el hallazgo de Gerstner y col. (2002), arriba. Por ejemplo, en ese trabajo, usando captura en fase de disolución de fago de 4D5, varias de las sustituciones identificadas aquí también se encontraron. Algunas posiciones mostraron sustituciones similares, por ejemplo, mutaciones de VL F53W, Y55W y Y92W se encontraron comúnmente en los experimentos previos. Sin embargo, las sustituciones no comúnmente encontradas en los experimentos previos incluyen residuos básicos (R, K, H) que se sustituyen en la posición de VH 98, y P que sustituye en la posición de VH 100. Estas mutaciones pueden actuar individualmente o en combinación con otras mutaciones para mejorar la afinidad de unión de 4D5 por HER2.

**Tabla 5.**

Resumen de residuos consenso por posición de selecciones por constante de disociación.		
Cadena	Posición	Residuo(s) preferido(s)
VL	D28	Q
VL	N30	S
VL	T31	S
VL	A32	G
VL	Y49	W, D, V
VL	F53	W
VL	Y55	W
VL	H91	Y, F
VL	Y92	W
VH	W95	Y
VH	D98	R, K, H
VH	F100	P

5 **Ejemplo 5**

CRIBADO DE CLONES DE 4D5 SELECCIONADOS DE LA SELECCIÓN POR CONSTANTE DE DISOCIACIÓN

**[0202]** Se eligieron clones representativos seleccionados por caracterización adicional en ensayos de ELISA de fago competitivo (Lowman, 1998). Varias variantes parecieron tener unión mejorada a HER2-ECD en comparación con el Fab de 4D5 natural (Tabla 6). Debido a la afinidad relativamente alta de 4d5 natural, este ensayo no proporciona una medida fidedigna de versiones maduras por afinidad de 4D5 (Gerstner y col., 2002); sin embargo, los presentes inventores han usado el ensayo para clasificar clones para el posterior análisis.

**Tabla 6.**

Resultados de ELISA de fago competitivo para fago de 4d5 seleccionado.

Clon	Cl <sub>50</sub> relativa	d.e.
WT	-1-	-
4d5.2	0,15	0,11
4d5.4	0,21	0,15
4d5.17	0,09	0,07
4d5.21	1,98	1,41

## ES 2 401 428 T3

Resultados de ELISA de fago competitivo para fago de 4d5 seleccionado.

Clon	CI <sub>50</sub> relativa	d.e.
4d5.22	0,06	0,04
4d5.28	0,10	0,07
4d5.31	0,18	1,06
4d5.35	0,35	1,04
4d5.44	0,40	0,82
4d5.50	1,49	0,85
4d5.51	1,47	0,28
4d5.55	1,16	0,04
4d5.57	1,20	0,85
4d5.64	0,40	0,28
4d5.67	0,05	0,04
4d5.80	1,93	1,37
4d5.81	1,26	0,89
4d5.83	0,08	0,06
4d5.84	0,21	0,14
4d5.92	2,08	0,67
D98W.1	2,76	1,13
D98W.2	3,77	0,95

**[0203]** La CI<sub>50</sub> informada relativa se calcula como CI<sub>50</sub>(natural)/CI<sub>50</sub>(variante); valores >1 reflejan afinidades aparentes mayores que las naturales. Los errores se informan como desviaciones estándar (d.e.). Para comparación también se muestran los valores para dos clones independientes de una variante previamente informada, D98W 5 (VH).

**[0204]** Basándose en los resultados del ensayo de ELISA de fago se predijo que varias variantes tenían afinidad de unión mejorada por HER2: 4d5.21, 4d5.50, 4d5.51, 4d5.55, 4d5.57, 4d5.80, 4d5.81 y 4d5.92. Las mutaciones puntuales identificadas entre todos estos clones se resumen en la Tabla 7. Por tanto, estas mutaciones están implicadas como que actúan por separado o sinérgicamente para mejorar la afinidad de unión de 4d5 por 10 HER2.

**Tabla 7.**

Resumen de mutaciones puntuales por posición encontradas entre variantes de mayor afinidad identificadas por cribado por ELISA de fago.		
Cadena	Posición	Residuo(s) preferido(s)
VL	D28	G
VL	N30	S

Resumen de mutaciones puntuales por posición encontradas entre variantes de mayor afinidad identificadas por cribado por ELISA de fago.		
Cadena	Posición	Residuo(s) preferido(s)
VL	T31	S
VL	Y49	W*, D*, V
VL	F53	V*, W*, Q
VL	R66	N, M
VL	H91	F*, W*
VL	Y92	W, F
VH	D98	R*, W
VH	F100	P*, L*, W
VH	Y102	W, L, K*
Se indican (*) las mutaciones que se producen en las dos mayores variantes de afinidad aparente, 4d5.21 y 4d5.92.		

**Ejemplo 6****MEDICIONES DE AFINIDAD DE CLONES DE 4D5 SELECCIONADOS DE SELECCIÓN POR CONSTANTE DE DISOCIACIÓN**

- 5 [0205] Para determinar las afinidades de unión ( $K_d$ ) en equilibrio de variantes de Fab, fragmentos Fab solubles se produjeron en *E. coli* y se probaron en un ensayo de unión BIAcore (Gerstner y col., 2002) usando HER2-ECD inmovilizado a 37°C. Las concentraciones de Fab se determinaron por análisis cuantitativo de aminoácidos. Los resultados de mediciones cinéticas se resumen en la Tabla 8.

**Tabla 8.**

Cinética y afinidades de unión de variantes de Fab de 4d5 seleccionadas usando un ensayo de resonancia de plasmones superficiales (BIAcore).

Variante	$k_{as}$ ( $/10^6/M/s$ )	$k_{dis}$ ( $10^4/s$ )	$K_d$ (pM)	s.d.	n	Afinidad relativa
4d5.51	1,32	0,18	14	8	2	7,6
4d5.80	1,49	0,23	16	n/a	1	6,7
D98W	2,99	0,80	27	15	12	3,9
4d5.50	1,94	0,81	42	25	3	2,5
4d5.21	3,57	2,60	73	28	9	1,4
WT	1,90	2,01	105	29	12	1,0
4d5.55	1,56	4,40	281	72	10	0,4

10

- [0206] En la Tabla 8 anterior, las afinidades de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) se calculan como  $k_{dis}/k_{as}$ , para  $n$  mediciones. Los errores se muestran como desviaciones estándar (d.e.). La afinidad relativa se calcula como  $K_d(WT)/K_d(variante)$ ; valores  $>1$  indican mayor afinidad aparente por HER2-ECD.

**[0207]** Los resultados de estos experimentos indican que Fab correspondientes a los clones de fago 4d5.51, 4d5.80 y 4d5.50, además del mutante puntual previamente descrito D98W (VH), tienen cada uno >2 veces de unión mejorada a HER2-ECD en comparación con WT. Para comparación, las sustituciones encontradas en cada una de estas variantes se resumen en la Tabla 9. Por otra parte, 4d5.21 y 4d5.55 tienen poca mejora, o son ligeramente más débiles en la unión.

**[0208]** La comparación de las constantes de asociación y las constantes de disociación relativas indica que mientras que D98W, identificado por selecciones de unión en fase de disolución (Gerstner y col., 2002), mejoró tanto en kas como kdis, las mejores variantes identificadas por selecciones de la constante de disociación rigurosas usando 4d5 inmovilizado tuvieron coherentemente kdis más lenta, con kas más lenta en comparación con WT.

10

**Tabla 9.**

Mutación puntual en variantes de 4d5 mejoradas por afinidad identificadas por análisis cinético. Los residuos que se diferencian de WT se muestran en negra; los residuos idénticos a WT se muestran (-).

Variante	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VH	VH	VH
Posición:	27	28	30	31	32	49	53	55	66	91	92	98	100	102
WT	Q	D	N	T	A	Y	F	Y	R	H	Y	D	F	Y
4d5.50	-	-	-	-	-	<b>D</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	-	-	-	-	<b>P</b>	<b>K</b>
4d5.51	-	-	-	-	-	<b>D</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	-	-	-	-	<b>P</b>	<b>L</b>
4d5.80	-	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	-	-	-	-	<b>N</b>	-	<b>W</b>	-	<b>P</b>	<b>K</b>
D98W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>W</b>	-	-

**Ejemplo 7**

**VARIANTES DE 4D5 PRODUCIDAS POR COMBINACIONES DE MUTACIONES SELECCIONADAS**

**[0209]** Debido a que las mutaciones podrían actuar individualmente o en combinación con otras mutaciones encontradas en el mismo selector del fago de 4d5, los presentes inventores estuvieron interesados en probar combinaciones de mutaciones de las variantes de mayor afinidad que incluyen las D98W (VH) previamente descritas. Se diseñó un conjunto de variantes para probar las contribuciones de "DWW" (es decir, mutaciones de VL D49D/F53W/Y55W) solas, además de "DWW" y "PL" o "PK" (es decir, mutaciones de VH F100P/Y102K o F100P/Y102L) en combinación con las mutaciones de VH D98W (Tabla 10).

20

**Tabla 10.**

Variantes de combinación de 4d5.

Variante	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VH	VH	VH
Posición:	27	28	30	31	32	49	53	55	66	91	92	98	100	102
WT	Q	D	N	T	A	Y	F	Y	R	H	Y	D	F	Y
d5-D98W-PK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>W</b>	<b>P</b>	<b>K</b>
4d5-D98W-PL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>W</b>	<b>P</b>	<b>L</b>
4d5-DWW	-	-	-	-	-	<b>D</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	-	-	-	-	-	-
4d5-D98W-DWW	-	-	-	-	-	<b>D</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	-	-	-	<b>W</b>	-	-

**[0210]** Los Fab de variante se produjeron por mutagénesis dirigida a sitio, se expresaron en *E. coli* y se ensayaron por unión a BIAcore a 37°C. En estos ensayos, las constantes de asociación y disociación se midieron como se ha descrito previamente (Gerstner y col., 2002), excepto que la fase de disociación de cada experimento se extendió a 30 min para permitir la medición más precisa de las constantes kdis muy lentas observadas. Los

resultados se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11.**

Afinidades de unión de análisis cinético (BIAcore) de variantes de 4d5 que combinan mutaciones de variantes de fago de 4d5 seleccionadas.

Variante	$k_{as}$ ( $/10^6/M/s$ )	$k_{dis}$ ( $10^4/s$ )	$K_d$ (nM)	s.d.	n	Afinidad relativa
WT	0,69	2,19	317	87	6	1,00
D98W	1,26	0,95	75	27	6	4,23
4d5.50	0,87	0,87	111	50	3	2,86
4d5.51	0,67	0,53	69	17	3	4,62
4d5.80	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4d5-D98W-PK	0,44	5,04	1146	109	3	0,28
4d5-D98W-PL	0,50	4,29	856	141	3	0,37
4d5-DWW	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4d5-PK	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4d5-D98W-DWW	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

**[0211]** En la tabla anterior,  $k_{as}$  y  $k_{dis}$  se ajustaron por separado usando el software BIAevaluation de BIAcore.

5 Las afinidades de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) se calculan como  $k_{dis}/k_{as}$ , para  $n$  mediciones. Los errores se muestran como desviaciones estándar (d.e.). La afinidad relativa se calcula como  $K_d(WT)/K_d(\text{variante})$ ; valores  $>1$  indican mayor afinidad aparente por HER2-ECD, N.D. = no determinado.

**[0212]** Los resultados de estos ensayos de larga disociación confirmaron que las variantes D98W, 4d5.50 y

10 4d5.51 tienen afinidad de unión mejorada por HER2 en comparación con naturales. Sin embargo, las combinaciones de D98W con 100P/Y102K o F100P/Y102L no produjeron mejoras aditivas en estos experimentos.

#### Depósito de material biológico

**[0213]** Las siguientes líneas celulares de hibridoma se han depositado en la Colección americana de cultivos tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

Designación de anticuerpo	ATCC nº	Fecha de depósito
4D5	ATCC CRL 10463	24 de mayo 1990

15

**[0214]** Este depósito se hizo bajo las provisiones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento de patente y las reglamentaciones en virtud del mismo (Tratado de Budapest). Éste asegura el mantenimiento de cultivos viables durante 30 años a partir de la fecha de depósito. Los organismos se pondrán a disposición por la ATCC bajo los términos del Tratado de

20 Budapest, y sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y de libre acceso de la progenie de los cultivos al público tras la concesión de la patente de EE.UU. pertinente o tras la apertura a consulta por el público de cualquier solicitud de patente de EE.UU. o extranjera, sea cual sea la que venga primero, y asegura la disponibilidad de la progenie a una determinada por el Comisionado de EE.UU. de patentes y marcas que tienen derecho al mismo según la sección 122 del título 35 del USC y las reglas del

25 Comisionado con arreglo al mismo (incluyendo el artículo 37 del CFR nº 1.12, con particular referencia a 886 OG 638).

**[0215]** Respecto a aquellas designaciones en las que se busca una patente europea, una muestra del microorganismo depositado se pondrá a disposición hasta la publicación de la mención de la concesión de la patente

europea o hasta la fecha en la que la solicitud ha sido rechazada o retirada o se determine que va a ser retirada, sólo por la emisión de una muestra tal para un experto nominado por la persona que solicita la muestra (regla 28(4) del CPE).

5 **[0216]** El cesionario de la presente solicitud está de acuerdo que si los cultivos en depósito mueren o se pierden o se destruyen cuando se cultivan bajo condiciones adecuadas, serán inmediatamente sustituidos tras la notificación por un espécimen viable del mismo cultivo. La disponibilidad de la cepa depositada no debe interpretarse como una licencia para poner en práctica la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno según sus leyes de patentes.

10 **[0217]** La memoria descriptiva anteriormente descrita se considera suficiente para permitir que un experto en la materia ponga en práctica la invención. La presente invención no va a limitarse en alcance por las construcciones depositadas, ya que está previsto que las realizaciones depositadas ilustren sólo ciertos aspectos de la invención y cualquier construcción que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance esta invención. El depósito de material en el presente documento no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en el presente documento sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el 15 mejor modo de la misma, ni debe considerarse como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representan. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de aquellas mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de la anterior descripción y se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

20 **[0218]** Se entiende que la aplicación de las enseñanzas de la presente invención a un problema o situación específico estará dentro de las capacidades de un experto en la materia en vista de las enseñanzas contenidas en el presente documento. No debe interpretarse que los ejemplos de los productos de la presente invención y procedimientos representativos para su aislamiento, uso y fabricación limiten la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

25 <120> VARIANTES DE ANTICUERPOS ANTI-HER2

<130> SMW/FP6254809

<140> 03721610.8

<141> 04-09-2003

<150> PCT/US03/11031

30 <151> 04-09-2003

<150> 60/371.609

<151> 04-10-2002

<160> 24

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

35 <210> 1

<211> 109

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

ES 2 401 428 T3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20      25      30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35      40      45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50      55      60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100      105

```

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 2

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20      25      30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50      55      60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100      105      110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115      120

```

<210> 3

<211> 33

10 <212> ADN

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> 16, 17

15 <223> N=A, G, T o C

<221> misc\_feature

<222> 18  
 <223> S=G o C  
 <400> 3  
 gccagtcagg atgtgnnsac tgctgtagcc tgg 33  
 5 <210> 4  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> 18, 19, 21, 22  
 <223> N=A,G,T, o C  
 <221> misc\_feature  
 <222> 20, 23  
 15 <223> S=G o C  
 <400> 4  
 ctattactg tcagcaanns nnsactactc ctcccacg 38  
 <210> 5  
 <211> 36  
 20 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 17, 18  
 25 <223> N=A,G,T, o C  
 <221> misc\_feature  
 <222> 19  
 <223> S=G o C  
 <400> 5  
 30 cctggaatgg gttgcannsa ttatcctac gaatgg 36  
 <210> 6  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 35 <220>

<221> misc\_feature  
 <222> 16, 17, 28, 29, 34, 35  
 <223> N=A,G,T o C  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> 18, 30, 36  
 <223> S=G o C  
 <400> 6  
 ctattattgt tctagannsg gaggggacnn sttcnnsqct atggactact gggg 54  
 <210> 7  
 10 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> 16, 17, 28, 29  
 <223> N=A, G, T o C  
 <221> misc\_feature  
 <222> 18, 30  
 <223> S=G o C  
 20 <400> 7  
 ccgaaactac tgattnnstc ggcacccnns ctctactctg gagtc 45  
 <210> 8  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 25 <213> homo sapiens  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 23, 24  
 <223> N=A, G, T, o C  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> 25  
 <223> S=G o C  
 <400> 8  
 cgcaacttat tactgtcagc aannstatac tactcctccc 40  
 35 <210> 9

<211> 45

<212> ADN

<213> homo sapiens

<220>

5 <221> misc\_feature

<222> 18, 19, 21, 22, 24, 25, 27, 28

<223> N=A, G, T o C

<221> misc\_feature

<222> 20, 23, 26, 29

10 <223> S=G o C

<400> 9

gttctagatg gggaggggnns nnsnnsnsg ctatggacta ctggg 45

<210> 10

<211> 35

15 <212> ADN

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> 16, 17

20 <223> N=A, G, T o C

<221> misc\_feature

<222> 18

<223> S=G o C

<400> 10

25 caacattaa gacaccnnsa tacactgggt gcgtc 35

<210> 11

<211> 62

<212> ADN

<213> homo sapiens

30 <220>

<221> misc\_feature

<222> 20, 21, 41, 42, 47, 48

<223> N=A, G, T o C

<221> misc\_feature

35 <222> 22, 43, 49

ES 2 401 428 T3

<223> S=G o C

<400> 11

gggcctggaa tgggttgcan nsatttatcc tacgaatggt nnsactnnst atgccgatag 60  
cg 62

<210> 12

5 <211> 34

<212> ADN

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

10 <222> 17, 18

<223> N=A, G, T o C

<221> misc\_feature

<222> 19

<223> N=G o C

15 <400> 12

ctattattgt tctagannsg gaggggacgg cttc 34

<210> 13

<211> 35

<212> ADN

20 <213> homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> 16, 17

<223> N=A, G, T o C

25 <221> misc\_feature

<222> 18

<223> S=G o C

<400> 13

cagcaacatt atactnscg tcccacggtc ggaca 35

30 <210> 14

<211> 81

<212> ADN

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> 41, 42, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 53, 54

<223> N=A, G, T o C

5 <221> misc\_feature

<222> 43, 46, 49, 52, 55

<223> S=G o C

<400> 14

```
gcggtgctgag gacactgccg tctattattg ttctagatgg nnsnnsnnsn nsnstatgc 60
tatggactac tgggtcaag g                                     81
```

10 <210> 15

<211> 54

<212> ADN

<213> homo sapiens

<220>

15 <221> misc\_feature

<222> 16, 17, 28, 29, 34, 35

<223> N=A, G, T o C

<221> misc\_feature

<222> 18, 30, 36

20 <223> S=G o C

<400> 15

```
ccgaaactac tgattnstc ggcacccns ctcnntctg gagtcccttc tcgc      54
```

<210> 16

<211> 47

25 <212> ADN

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> 15, 16, 30, 31

30 <223> N=A, G, T o C

<221> misc\_feature

<222> 17, 32

<223> S=G o C

ES 2 401 428 T3

<400> 16

ggggagggga cggnnstat gctatggacn nstgggtca aggaacc 47

<210> 17

<211> 43

5 <212> ADN

<213> homo sapiens

<400> 17

tgtaaacga cgccagtc gtttagtgt tttcagagc act 43

<210> 18

10 <211> 42

<212> ADN

<213> homo sapiens

<400> 18

caggaaacag ctatgaccgt tccacgacac cgtcaccgt tc 42

15 <210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala  
1 5 10

20

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

25 <400> 20

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser  
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

30 <213> homo sapiens

<400> 21

ES 2 401 428 T3

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr  
1 5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 22

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His  
1 5 10

<210> 23

<211> 17

10 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 23

Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15  
Gly

<210> 24

15 <211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 24

Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

20

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo que es capaz de unirse al dominio extracelular de HER2, cuyo anticuerpo comprende:  
un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende las regiones hipervariables de SEQ ID NO: 2 con D98(V<sub>H</sub>) numerado según el sistema de numeración de Kabat sustituido con W y
- 5 un dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo que comprende las regiones hipervariables de SEQ ID NO: 1;  
o  
un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende las regiones hipervariables de SEQ ID NO: 2 y  
un dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo que comprende las regiones hipervariables de SEQ ID NO: 1,
- 10 con sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las siguientes, numeradas según el sistema de numeración de Kabat:
  - (i) Y49(V<sub>L</sub>)D, F53(V<sub>L</sub>)W, Y55(V<sub>L</sub>)W, F100(V<sub>H</sub>)P, Y102(V<sub>H</sub>)K;
  - (ii) Y49(V<sub>L</sub>)D, F53(V<sub>L</sub>)W, Y55(V<sub>L</sub>)W, F100(V<sub>H</sub>)P, Y102(V<sub>H</sub>)L;
  - (iii) D28(V<sub>L</sub>)G, N30(V<sub>L</sub>)S, T31(V<sub>L</sub>)S, R66(V<sub>L</sub>)N, Y92(V<sub>L</sub>)W, F100(V<sub>H</sub>)P, Y102(V<sub>H</sub>)K.
- 15 2. Anticuerpo, según la reivindicación 1, que es un anticuerpo humanizado.
3. Anticuerpo, según la reivindicación 1, que es un anticuerpo humano.
4. Anticuerpo, según la reivindicación 1, que es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los fragmentos F<sub>v</sub>, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>.
5. Anticuerpo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una región variable de la
- 20 cadena pesada del anticuerpo que comprende las regiones hipervariables de SEQ ID NO:2 y un dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo que comprende las regiones hipervariables de SEQ ID NO:1 con las siguientes sustituciones: Y49(V<sub>L</sub>)D, F53(V<sub>L</sub>)W, Y55(V<sub>L</sub>)W, F100(V<sub>H</sub>)P y Y102(V<sub>H</sub>)L.
6. Anticuerpo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una región variable de la
- 25 cadena pesada del anticuerpo que comprende las regiones hipervariables de SEQ ID NO:2 y un dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo que comprende las regiones hipervariables de SEQ ID NO:1 con las siguientes sustituciones: Y49(V<sub>L</sub>)D, F53(V<sub>L</sub>)W, Y55(V<sub>L</sub>)W, F100(V<sub>H</sub>)P y Y102(V<sub>H</sub>)K.

**Figura 1A**

	10	20	30	40	50	
HU4D5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYS					
	-----					
						V <sub>L</sub> -región hipervariable 2
						V <sub>L</sub> -región hipervariable 1
	60	70	80	90	100	
HU4D5	GVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT					
	-----					
						V <sub>L</sub> -región hipervariable 3

**Figura 1B**

```

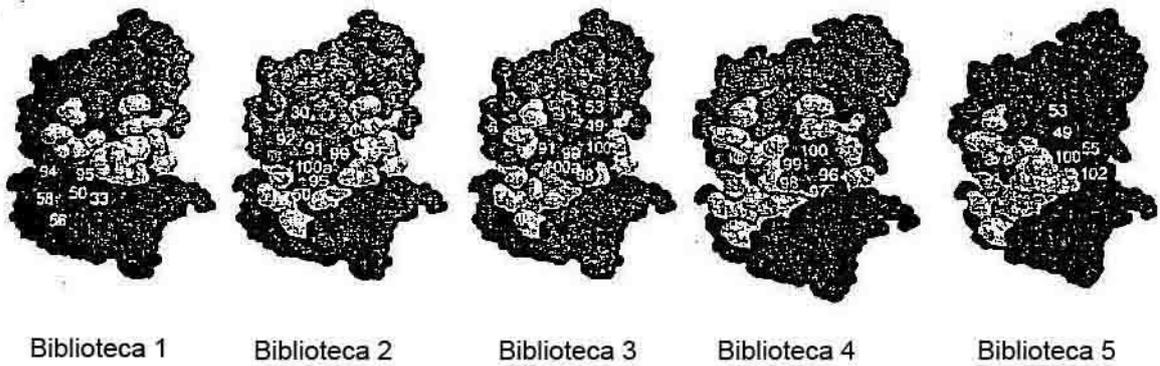
10      20      30      40      50  a
HU4D5  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN
      -----
      VH-región hipervariable 1      VH-región hipervariable 2
      -----
60      70      80  abc  90      100abc
HU4D5  GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
      -----
      VH-región hipervariable 3
      -----
110
HU4D5  GQGLLTVTSS
    
```

W:\DOCS\NM\NM-5031.DOC  
040703  
W:\DOCSZY\WZYW-1075.DOC

**Figura 2A**

Biblioteca	cadena	Aminoácido
1	Ligera	94
	Pesada	33,50,56,58,95
2	Ligera	30,91,92
	Pesada	50,95,99,100a
3	Ligera	49,53,91
	Pesada	98,99,100,100a
4	Ligera	
	Pesada	96,97,98,99,100
5	Ligera	49,53,55
	Pesada	100,102

**Figura 2B**



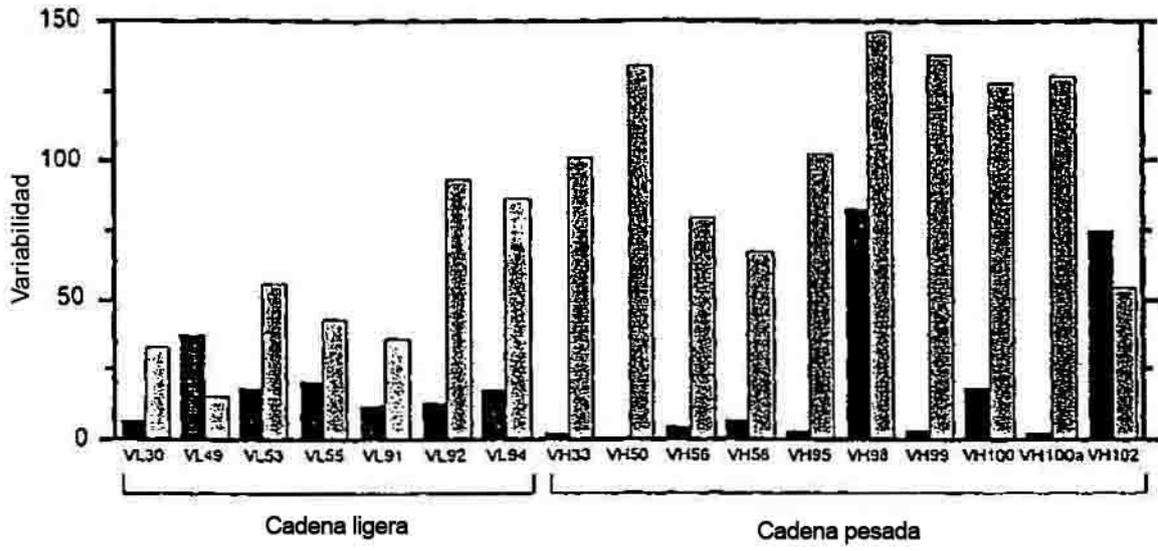
**Figura 3**

residuo	4D5 †	BIB	O	E	K	R	H	G	S	T	C	N	Q	A	V	L	I	M	P	F	W	Y	NU	NT	
<b>Clase 1</b>																									
V <sub>L</sub> 30	N	2						3%	53%			34%			2%	7%							31	78	
V <sub>H</sub> 33	Y	1																			39%	61%	31	68	
V <sub>H</sub> 50	R	1				100%																	31	68	
V <sub>H</sub> 56	R	2				100%															10%	13%	74%	31	78
V <sub>H</sub> 58	Y	1																					31	68	
V <sub>H</sub> 95	R	1			12%	56%								3%	23%	6%					26%	59%	15%	30	67
V <sub>H</sub> 99	W	2																			6%	82%	12%	32	78
V <sub>H</sub> 100a	G	2						100%															33	78	
	G	3						90%	3%	3%				3%	1%								70	71	
	Y	2																					33	78	
	Y	3								1%											10%			69	70
<b>Clase 2</b>																									
V <sub>L</sub> 49	Y	3		4%					3%	3%														69	70
V <sub>L</sub> 53	F	5		4%	16%						2%		2%											57	57
V <sub>L</sub> 55	F	3				2%			1%	2%														69	70
V <sub>L</sub> 55	W	5				1%			2%	1%														57	57
V <sub>L</sub> 91	Y	5		2%		1%			1%	1%														57	57
V <sub>L</sub> 91	H	2				2%																		33	78
V <sub>L</sub> 92	F	3				26%							3%											69	70
V <sub>L</sub> 92	F	3				19%							1%								45%	1%	32%	69	70
V <sub>L</sub> 94	Y	2						3%	3%				3%								16%	41%	16%	31	78
V <sub>L</sub> 94	T	1							5%	45%			5%								5%	27%		30	67
V <sub>H</sub> 100	F	3				1%															52%	2%	2%	67	68
V <sub>H</sub> 100	W	5																			30%	34%	3%	54	55
<b>Clase 3</b>																									
V <sub>H</sub> 98	D	3		2%	2%			2%	2%	3%			2%								6%	23%	9%	69	70
V <sub>H</sub> 102	Y	5		3%				4%	1%	3%			3%								9%	3%		57	57

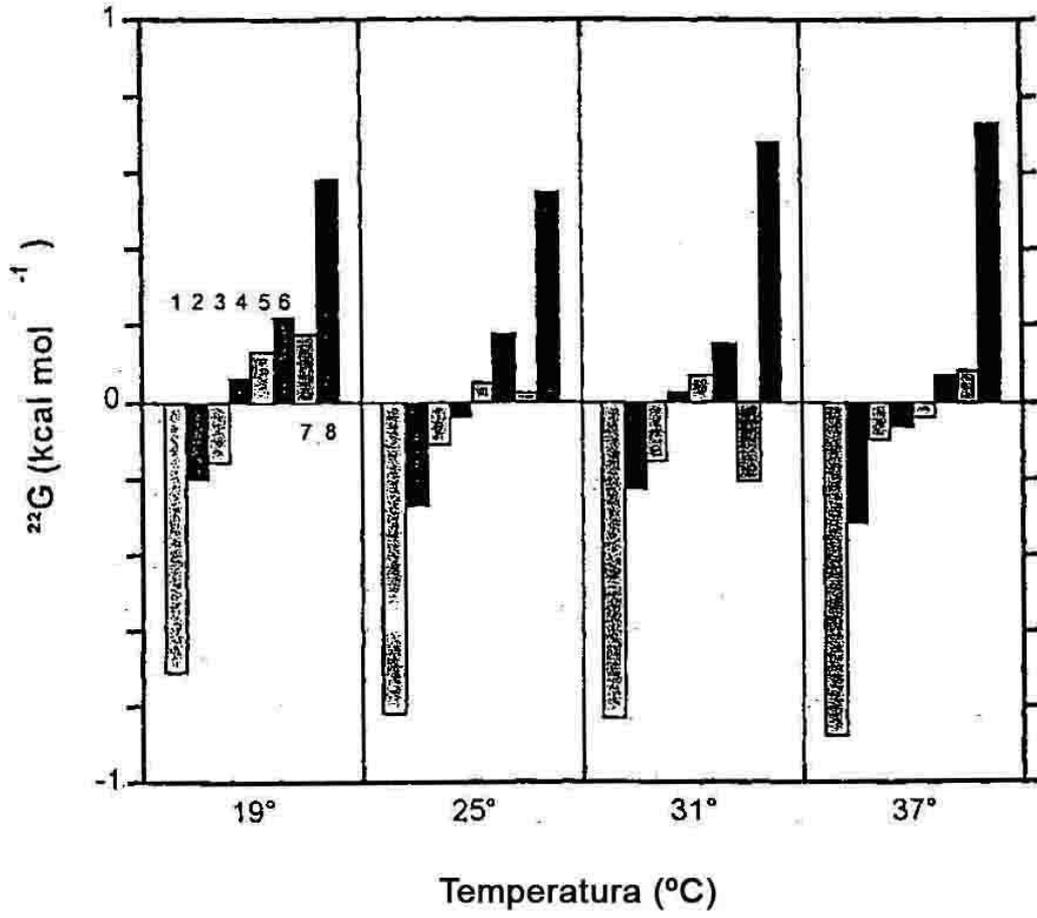
Figura 4

mutante	$k_{as}$ ( $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$k_{dis}$ ( $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ )	$K_D$ (37°C) (nM)
wt	10 ± 1,6	3,5 ± 0,1	0,35 ± 0,05
N30(V <sub>L</sub> )S	10 ± 3,4	4,0 ± 0,1	0,39 ± 0,11
H91(V <sub>L</sub> )F	9,7 ± 3,3	3,6 ± 0,2	0,37 ± 0,15
N30(V <sub>L</sub> )S + H91(V <sub>L</sub> )F + Y92(V <sub>L</sub> )W	11 ± 4,4	3,5 ± 0,3	0,31 ± 0,16
T94(V <sub>L</sub> )S	9,3 ± 3,5	5,5 ± 0,2	0,59 ± 0,25
D98(V <sub>H</sub> )W	17 ± 4,5	1,9 ± 0,2	0,11 ± 0,04
Y100a(V <sub>H</sub> )F	9,0 ± 3,6	13 ± 0,2	1,4 ± 0,56
Y102(V <sub>H</sub> )V	12 ± 1,4	6,2 ± 1,6	0,51 ± 0,15
N30(V <sub>L</sub> )S + H91(V <sub>L</sub> )F + Y92(V <sub>L</sub> )W + T94(V <sub>L</sub> )S + D98(V <sub>H</sub> )W + Y100a(V <sub>H</sub> )F + Y102(V <sub>H</sub> )V	22 ± 3,1	8,4 ± 1,6	0,38 ± 0,04

**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**

