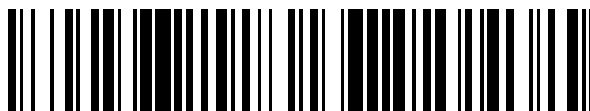


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 466 715**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2000** **E 10177413 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014** **EP 2283867**

54 Título: **Métodos de tratamiento usando conjugados de anticuerpo anti-ErbB-maitansinoide**

30 Prioridad:

25.06.1999 US 141316 P
16.03.2000 US 189844 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.06.2014

73 Titular/es:

IMMUNOGEN, INC. (100.0%)
830 Winter Street
Waltham, MA 02451-1477, US

72 Inventor/es:

ERICKSON, SHARON;
SCHWALL, RALPH;
SLIWKOWSKI, MARK X. y
BLATTLER, WALTER

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 466 715 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

Métodos de tratamiento usando conjugados de anticuerpo anti-ErbB-maitansinoide

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a conjugados de anticuerpo anti-receptor ErbB-maitansinoide para su uso en métodos para tratamientos con terapias del cáncer dirigidas a receptores ErbB.

Descripción de la técnica relacionada

1. Maitansina y maitansinoides

- 10 La maitansina fue aislada por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de EEUU n.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (patente de EEUU n.º 4.151.042). Se describen el maitansinol y análogos del maitansinol sintéticos, por ejemplo, en las patentes de EEUU n.ºs 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

- 15 La maitansina y los maitansinoides son muy citotóxicos, pero su uso clínico en la terapia del cáncer se ha visto seriamente limitado por sus graves efectos secundarios sistémicos atribuidos principalmente a su baja selectividad por tumores. Los ensayos clínicos con maitansina han tenido que detenerse debido a los graves efectos adversos sobre el sistema nervioso central y el sistema gastrointestinal (Issel *et al.*, *Can. Trtmnt. Rev.*, 5:199-207 (1978)).

2. La familia ErbB de receptores de tirosina quinasas y anticuerpos anti-ErbB

- 20 Los miembros de la familia ErbB de receptores de tirosina quinasas son importantes mediadores del crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular. La familia de receptores incluyen cuatro miembros diferenciados, que incluyen el receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR o ErbB1), HER2 (ErbB2 o p185^{neu}), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).

- 25 El receptor p185^{neu} fue identificado originariamente como el producto del gen transformante procedente de neuroblastomas de ratas tratadas de modo químico. La forma activada del protooncogén *neu* se produce como resultado de una mutación puntual (de valina a ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. Se observa amplificación del homólogo humano de *neu* en cánceres de mama y ovario, y se correlaciona con una mala prognosis (Slamon *et al.*, *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon *et al.*, *Science*, 244:707-712 (1989); y patente de EEUU n.º 4.968.603). Hasta la fecha, no se ha indicado ninguna mutación puntual análoga a la del protooncogén *neu* para tumores humanos. También se ha observado la sobreexpresión de ErbB2 (con frecuencia, pero no de forma uniforme, debida a la amplificación de genes) en otros carcinomas, que incluyen carcinomas de estómago, endometrio, glándulas salivares, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. Véase, entre otros, King *et al.*, *Science*, 229:974 (1985); Yokota *et al.*, *Lancet*, 1:765-767 (1986); Fukushima *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Geurin *et al.*, *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen *et al.*, *Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura *et al.*, *Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst *et al.*, *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner *et al.*, *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern *et al.*, *Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park *et al.*, *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau *et al.*, *Mol. Carcinog.*, 3:354-357 (1990); Aasland *et al.*, *Br. J. Cancer*, 57:358-363 (1988); Williams *et al.*, *Pathobiology*, 59:46-52 (1991); y McCann *et al.*, *Cancer*, 65:88-92 (1990). ErbB2 puede estar sobreexpresado en cáncer de próstata (Gu *et al.*, *Cancer Lett.*, 99:185-9 (1996); Ross *et al.*, *Hum. Pathol.*, 28:827-33 (1997); Ross *et al.*, *Cancer*, 79:2162-70 (1997); y Sadasivan *et al.*, *J. Urol.*, 150:126-31 (1993)). Una forma de corte y empalme del oncogén *erbB2* que codifica un receptor ErbB2 constitutivamente fosforilado en la tirosina se describe en la solicitud PCT WO 00/20579, publicada el 13 de abril, 2000. La proteína *erbB2* codificada por el variante de corte y empalme tiene una delección dentro de marco de 16 aminoácidos (CVDLDDKGCPAEQRAS), dos de los cuales son restos cisteína conservados.

- 45 Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos de proteínas de ErbB2 humano y p185^{neu} de rata. Drebin *et al.* han generado anticuerpos contra el producto del gen *neu* de rata, p185^{neu}. Véase, por ejemplo, Drebin *et al.*, *Cell*, 41:695-706 (1985); Myers *et al.*, *Meth. Enzym.*, 198:277-290 (1991); y el documento WO94/22478. Drebin *et al.*, *Oncogene*, 2:273-277 (1988) indican que mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones diferenciadas de p185^{neu} dan como resultado unos efectos antitumorales sinérgicos en células NIH-3T3 transformadas con *neu* implantadas en ratones atímicos. Véase, también la patente de EEUU n.º 5.824.311, expedida el 20 de octubre, 1998.

- 50 Se han descrito otros anticuerpos anti-ErbB2 con diversas propiedades en Tagliabue *et al.*, *Int. J. Cancer*, 47:933-937 (1991); McKenzie *et al.*, *Oncogene*, 4:543-548 (1989); Maier *et al.*, *Cancer Res.*, 51:5361-5369 (1991); Bacus *et al.*, *Molecular Carcinogenesis*, 3:350-362 (1990); Stancovski *et al.*, *PNAS (USA)*, 88:8691-8695 (1991); Bacus *et al.*, *Cancer Research*, 52:2580-2589 (1992); Xu *et al.*, *Int. J. Cancer*, 53:401-408 (1993); el documento WO94/00136; Kasprzyk *et al.*, *Cancer Research*, 52:2771-2776 (1992); Hancock *et al.*, *Cancer Res.*, 51:4575-4580 (1991);

Shawver *et al.*, *Cancer Res.*, 54:1367-1373 (1994); Arteaga *et al.*, *Cancer Res.*, 54:3758-3765 (1994); Harwerth *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:15160-15167 (1992); la patente de EEUU n.º 5.783.186; y Klapper *et al.*, *Oncogene*, 14:2099-2109 (1997).

Hudziak *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9(3):1165-1172 (1989) describen la generación de un panel de anticuerpos anti-ErbB2 que se caracterizaron utilizando la línea de células de tumor de mama humano SK-BR-3. Se determinó la proliferación celular relativa de las células SK-BR-3 después de la exposición a anticuerpos mediante tinción con violeta cristal de las monocapas después de 72 horas. Utilizando este ensayo, se obtuvo la máxima inhibición con el anticuerpo denominado 4D5, que inhibe la proliferación celular en 56%. Otros anticuerpos en el panel redujeron la proliferación celular en un grado menor en este ensayo. También se descubrió que el anticuerpo 4D5 sensibiliza a líneas de células de tumor de mama que sobreexpresan ErbB2 frente a los efectos citotóxicos del TNF-. Véase también la patente de EEUU n.º 5.677.171, expedida el 14 de octubre, 1997. Los anticuerpos anti-ErbB2 analizados en Hudziak *et al.* han sido caracterizados más a fondo en Fendly *et al.*, *Cancer Research*, 50:1550-1558 (1990); Kotts *et al.*, *In Vitro*, 26(3):59A (1990); Sarup *et al.*, *Growth Regulation*, 1:72-82 (1991); Shepard *et al.*, *J. Clin. Immunol.*, 11(3):117-127 (1991); Kumar *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 11(2):979-986 (1991); Lewis *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 37:255-263 (1993); Pietras *et al.*, *Oncogene*, 9:1829-1838 (1994); Vitetta *et al.*, *Cancer Research*, 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994); Scott *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:14300-5 (1991); D'souza *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:7202-7206 (1994); Lewis *et al.*, *Cancer Research*, 56:1457-1465 (1996); y Schaefer *et al.*, *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997).

El anticuerpo anti-HER2 monoclonal murino inhibe el crecimiento de líneas de cáncer de mama que sobreexpresan HER2 en el nivel 2+ y 3+, pero no presenta actividad sobre células que expresan niveles más bajos de HER2 (Lewis *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* (1993)). Basándose en esta observación, el anticuerpo 4D5 se humanizó (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285-4289 (1992)). La versión humanizada denominada HERCEPTIN® (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, patente de EEUU n.º 5.821.337) se ensayó en pacientes con cáncer de mama cuyos tumores sobreexpresan HER2, pero que han avanzado después de una quimioterapia convencional (Baselga *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 14:737-744 (1996)); Cobleigh *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 17: 2639-2648 (1999)). La mayoría de los pacientes en este ensayo expresan HER2 al nivel 3+, aunque una fracción la constituían tumores 2+. De forma notable, HERCEPTIN® induce respuestas clínicas en 15% de los pacientes (una respuesta completa en 4% de los pacientes, y respuestas parciales en 11%), y la mediana de la duración de estas respuestas fue de 9,1 meses. HERCEPTIN® ha recibido el permiso de comercialización de the Food and Drug Administration el 25 de septiembre, 1998, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína de ErbB2.

La búsqueda de homología ha dado como resultado la identificación de otros dos miembros de la familia del receptor ErbB: ErbB3 (patentes de EEUU n.ºs 5.183.884 y 5.480.968, así como Kraus *et al.*, *PNAS (USA)*, 86:9193-9197 (1989)) y ErbB4 (solicitud de patente EP n.º 599.274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman *et al.*, *Nature*, 366:473-475 (1993)). Estos dos receptores muestran una mayor expresión en al menos algunas líneas de células de cáncer de mama.

3. Conjugados de maitansinoide-anticuerpo

En un intento para mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides han sido conjugados con anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides se describen, por ejemplo, en las patentes de EEUU n.ºs 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1.

Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:8618-8623 (1996) describen inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado es muy citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas, y muestra actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, *Cancer Research*, 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjuga a través de un conector de disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno sobre líneas de células de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino, TA.1, que se une al oncogén *neu*/HER2. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea de células de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de la superficie de HER2 por célula. El conjugado de fármaco logró un grado de citotoxicidad similar al del fármaco de maitansinoide libre, que puede aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide muestra una baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Aunque HERCEPTIN® es un importante avance en el tratamiento de pacientes con cánceres de mama que sobreexpresan ErbB2 que han recibido una extensa terapia anticáncer previa, en general aproximadamente 85% de los pacientes en esta población no responden, o responden muy mal, al tratamiento con HERCEPTIN®, y en el ensayo clínico anterior al permiso de comercialización, la mediana del tiempo hasta el avance de la enfermedad en todos los pacientes tratados fue solo de 3,1 meses. Por tanto, existe una significativa necesidad clínica de desarrollar otras terapias para el cáncer dirigidas a HER2 para los pacientes con tumores que sobreexpresan HER2 u otras enfermedades asociadas con la expresión de HER2 que no responden, o responden muy mal, a un

tratamiento con HERCEPTIN®.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el inesperado descubrimiento experimental de que los conjugados de HERCEPTIN®-maitansinoide son muy eficaces para el tratamiento de tumores que sobreexpresan HER2 (ErbB2) que no responden, o responden muy mal, a una terapia con HERCEPTIN®.

Basándose en la descripción contenida en la presente memoria, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo-maitansinoide, en el que el anticuerpo es huMAb4D5-8, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, para su uso para tratar el cáncer en un paciente humano, en el que el cáncer se caracteriza por la sobreexpresión del receptor ErbB2.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un conjugado de anticuerpo-maitansinoide, en el que el anticuerpo es huMAb4D5-8, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, para su uso para tratar el cáncer en un paciente humano, en el que el cáncer se caracteriza por la sobreexpresión del receptor ErbB2.

La presente invención y sus realizaciones se indican en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la estructura del maitansinoide denominado "DM1".

La figura 2 ilustra la estructura de un conjugado de HERCEPTIN®-DM1.

La figura 3 es el perfil de elución del conjugado de HERCEPTIN®-DM1 sobre una columna de filtración en gel de Sephacryl S300.

La figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos de una construcción de plásmido con el transgén HER2 (SEQ ID NO:1) que dirige la expresión de HER2 humano nativo (ErbB2) en la glándula mamaria de un ratón transgénico. La figura incluye la secuencia de nucleótidos del inserto de ADNc de HER2 (ErbB2) (SEQ ID NO:2), así como la secuencia de aminoácidos deducida de HER2 (ErbB2) (SEQ ID NO:3), que incluye la secuencia señal. Dentro de los restos desde aproximadamente 22 hasta aproximadamente 645, ambos inclusive, representan el dominio extracelular de HER2 (ErbB2).

La figura 5 ilustra el efecto de HERCEPTIN®-DM1 sobre tumores HER2-transgénicos. Se trasplantaron trozos de 2 mm³ de tumores MMTV-HER2-transgénicos hacia la almohadilla de grasa mamaria de ratones FVB. Cuando los tumores alcanzaron 250 mm³, grupos de 8 ratones fueron inyectados i.v. en 5 días consecutivos con un conjugado de HERCEPTIN®-DM1. Otros dos grupos de ratones fueron tratados i.p. dos veces semanales con 10 mg/kg de HERCEPTIN® o RITUXAN®.

La figura 6 muestra la secuencia de la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-HER2 humanizado 2C4.

La figura 7 muestra la secuencia de la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-HER2 humanizado 2C4.

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención (Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, N.Y., 1994). Los expertos en la técnica reconocerán muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria que pueden utilizarse en la práctica de la presente invención. En efecto, la presente invención no se limita de ningún modo a los métodos y los materiales descritos. Para los objetivos de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos y expresiones.

Un "receptor ErbB" o "ErbB" es un receptor de proteína tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores ErbB y que incluye receptores ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4) y otros miembros de esta familia que serán identificados en el futuro. La definición incluye específicamente receptores ErbB codificados por formas de corte y empalme de los correspondientes oncogenes erbB que incluyen, sin limitación, el variante de delección de ErbB2 descrito en la publicación PCT n.º WO 00/20579 (publicada el 13 de abril, 2000). El receptor ErbB comprenderá en general un dominio extracelular, que puede unirse a un ligando de ErbB; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio de tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo-terminal que porta varios restos tirosina que pueden estar fosforilados. El receptor ErbB puede ser una

receptor ErbB "de secuencia nativa" o un derivado funcional, tal como uno de sus "variantes de secuencia de aminoácidos". Preferiblemente, el receptor ErbB es el receptor ErbB humano de secuencia nativa.

Los términos y la expresión "ErbB1", "receptor del factor del crecimiento epidérmico" y "EGFR" se emplean de modo intercambiable en la presente memoria y se refieren a EGFR de secuencia nativa, tal como se describe, por ejemplo, en Carpenter *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.*, 56:881-914 (1987), que incluye sus formas mutantes naturales (por ejemplo, un mutante de delección de EGFR, como en Humphrey *et al.*, *PNAS (USA)*, 87:4207-4211 (1990)), y sus derivados funcionales, tales como variantes de secuencia de aminoácidos. *erbB1* se refiere al gen que codifica el producto de proteína de EGFR.

Los términos "ErbB2" y "HER2" también se emplean de modo intercambiable en la presente memoria y se refieren a la proteína de HER2 humano de secuencia nativa descrita, por ejemplo, en Semba *et al.*, *PNAS (USA)*, 82:6497-6501 (1985), y Yamamoto *et al.*, *Nature*, 319:230-234 (1986) (n.º de registro de Genbank X03363), y los derivados funcionales, tales como sus variantes de secuencia de aminoácidos. El término *erbB2* se refiere al gen que codifica HER2 humano, y *neu* se refiere al gen que codifica p185^{neu} de rata. El HER2 preferido es el HER2 humano de secuencia nativa. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a HER2 incluyen los MAb 4D5 (ATCC CRL 10463), 2C4 (ATCC HB-12697), 7F3 (ATCC HB-12216), y 7C2 (ATCC HB 12215) (véase la patente de EEUU n.º 5.772.997; WO98/77797; y la patente de EEUU n.º 5.840.525). Los anticuerpos anti-HER2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®), tal como se describe en la tabla 3 de la patente de EEUU n.º 5.821.337; y 520C9 humanizado (documento WO93/21319). Los anticuerpos anti-HER2 humanos se describen en la patente de EEUU n.º 5.772.997, expedida el 30 de junio, 1998, y el documento WO 97/00271, publicado el 3 de enero, 1997.

"ErbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido del receptor según se describe, por ejemplo, en las patentes de EEUU n.º 5.183.884 y 5.480.968, así como en Kraus *et al.*, *PNAS (USA)*, 86:9193-9197 (1989), y los derivados funcionales, que incluyen sus variantes de secuencia de aminoácidos. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a HER3 se describen en la patente de EEUU n.º 5.968.511 (Akita y Sliwowski), por ejemplo, el anticuerpo 8B8 (ATCC HB 12070) o uno de sus variantes humanizados.

Los términos "ErbB4" y "HER4" en la presente memoria se refieren al polipéptido del receptor, tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente EP n.º 599.274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman *et al.*, *Nature*, 366:473-475 (1993), y los derivados funcionales, que incluyen sus variantes de secuencia de aminoácidos, tales como las isoformas de HER4 descritas en el documento WO 99/19488.

Un polipéptido de EGFR, HER2, HER3 o HER4 "nativo" o "de secuencia nativa" puede aislarse de la naturaleza, producirse mediante técnicas de la tecnología del ADN recombinante, sintetizarse de modo químico, o producirse mediante cualquier combinación de estos métodos o de métodos similares.

Los "derivados funcionales" incluyen variantes de secuencia de aminoácidos y derivados covalentes del polipéptido nativo, con la condición de que conserven una actividad biológica cualitativa del correspondiente polipéptido nativo. Los variantes de secuencia de aminoácidos en general se diferencian de una secuencia nativa en la sustitución, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos en cualquier posición dentro de una secuencia de aminoácidos nativa. Los variantes de delección incluyen fragmentos de los polipéptidos nativos, y los variantes que tienen truncamientos N- y/o C-terminales. Normalmente, los variantes de secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente 70% de homología, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de homología con un polipéptido nativo.

La "homología" se define como el porcentaje de restos en el variante de secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de homología. Los métodos y los programas informáticos para el alineamiento son muy conocidos en la técnica. Uno de estos programas informáticos es "Align 2", creado por Genentech, Inc., que se ha sido archivado con la documentación para el usuario en the United States Copyright Office, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre, 1991.

Un "ligando de ErbB" significa un polipéptido que se une y/o activa un receptor ErbB. El ligando de ErbB de interés concreto en la presente memoria es un ligando de ErbB humano de secuencia nativa, tal como el factor del crecimiento epidérmico (EGF) (Savage *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 247:7612-7621 (1972)); el factor del crecimiento transformante-alfa (TGF-alfa) (Marquardt *et al.*, *Science*, 223:1079-1082 (1984)); la anfirregulina, también conocida como factor del crecimiento autocrino de queratinocitos o schwannoma (Shoyab *et al.*, *Science*, 243:1074-1076 (1989); Kimura *et al.*, *Nature*, 348:257-260 (1990); y Cook *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 11:2547-2557 (1991)); la betacelulina (Shing *et al.*, *Science*, 259:1604-1607 (1993); y Sasada *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190:1173 (1993)); el factor del crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) (Higashiyama *et al.*, *Science*, 251:936-939 (1991)); la epirregulina (Toyoda *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:7495-7500 (1995); y Komurasaki *et al.*, *Oncogene*, 15:2841-2848 (1997)), una herregulina (véase a continuación); la neurregulina-2 (NRG-2) (Carraway *et al.*, *Nature*, 387:512-516 (1997)); la neurregulina-3 (NRG-3) (Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:9562-9567 (1997)); o cripto(CR-1) (Kannan *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272(6):3330-3335 (1997)). Los ligandos de ErbB que se unen a EGFR incluyen EGF, TGF-alfa, anfirregulina, betacelulina, HB-EGF y epirregulina. Los ligandos de ErbB que se unen a

HER3 incluyen herregulinas. Los ligandos de ErbB capaces de unirse a HER4 incluyen betacelulina, epirregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3 y herregulinas.

Una "herregulina" (HRG), cuando se emplea en la presente memoria, se refiere a un polipéptido que activa los complejos de proteínas de ErbB2-ErbB3 y ErbB2-ErbB4 (es decir, induce la fosforilación de los restos tirosina en el complejo tras su unión a él). Se describen diversos polipéptidos de herregulina englobados por este término en Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205-1210 (1992); el documento WO 92/20798; Wen *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 14(3):1909-1919 (1994); y Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312-318 (1993), por ejemplo. El término incluye los fragmentos biológicamente activos y/o variantes de un polipéptido de HRG natural, tal como uno de sus fragmentos de dominio similar a EGF (por ejemplo, HRG $\beta_{177-244}$).

Un "heterooligómero de ErbB" en la presente memoria es un oligómero asociado de forma no covalente que comprende al menos dos receptores ErbB diferentes. Estos complejos pueden formarse cuando una célula que expresa dos o más receptores ErbB se expone a un ligando de ErbB y puede aislarse mediante inmunoprecipitación y analizarse mediante SDS-PAGE según se describe en Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994), por ejemplo. Los ejemplos de estos heterooligómeros de ErbB incluyen los complejos de EGFR-HER2, HER2-HER3 y HER3-HER4. Además, el heterooligómero de ErbB puede comprender dos o más receptores HER2 combinados con un receptor ErbB diferente, tal como HER3, HER4 o EGFR. En el heterooligómero pueden incluirse otras proteínas, tales como una subunidad del receptor de citoquinas (por ejemplo, gp130).

En el contexto de los variantes de HER2, tales como fragmentos de HER2, la expresión "que tiene la actividad biológica de un HER2 humano nativo" se emplea para referirse a la capacidad cualitativa de dichos fragmentos para inducir el crecimiento tumoral cuando se sobreexpresan en un modelo animal (transgénico o no transgénico).

Un "tumor", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier crecimiento y proliferación celular neoplásico, tanto maligno como benigno, y a todos los tejidos y las células precancerosas y cancerosas.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen el trastorno fisiológico en mamíferos que se caracteriza generalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o malignidades linfoides. Los ejemplos más concretos de estos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer renal o de riñón, cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Un cáncer que "sobreexpresa" un receptor ErbB es un cáncer que tiene niveles significativamente mayores de un receptor ErbB, tal como HER2, en la superficie de sus células, comparado con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Esta sobreexpresión puede estar provocada por una amplificación de genes o por una mayor transcripción o traducción. La sobreexpresión del receptor ErbB puede ser determinada en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando unos mayores niveles de la proteína de ErbB presente sobre la superficie de una célula (por ejemplo, a través de un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). Como alternativa, o además, se pueden medir los niveles de ácidos nucleicos que codifican ErbB en la célula, por ejemplo, a través de hibridación *in situ* fluorescente (FISH, véase el documento WO98/45479, publicado en octubre, 1998), análisis de la transferencia Southern, o técnicas de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), tales como una PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión del receptor ErbB midiendo el antígeno desprendido (por ejemplo, el dominio extracelular de ErbB) en un fluido biológico, tal como suero (véase, por ejemplo, la patente de EEUU n.º 4.933.294, expedida el 12 de junio, 1990; el documento WO91/05264, publicado el 18 de abril, 1991; la patente de EEUU n.º 5.401.638, expedida el 28 de marzo, 1995; y Sias *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 132: 73-80 (1990)). Además de los anteriores ensayos, los expertos en la técnica pueden utilizar diversos ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células en el paciente, por ejemplo, mediante barrido externo para detectar radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Los tumores que sobreexpresan HER2 se clasifican mediante puntuaciones inmunohistoquímicas que se corresponden con el número de copias de moléculas de HER2 expresadas por célula, y esto puede realizarse de modo bioquímico: 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. La sobreexpresión de HER2 al nivel 3+, que conduce a una activación independiente del ligando de la tirosina quinasa (Hudziak *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7159-7163 (1987)), se produce en aproximadamente 30% de los cánceres de mama y, en estos pacientes, la supervivencia sin recaída y la supervivencia global son menores (Slamon *et al.*, *Science*, 244:707-712 (1989); Slamon *et al.*, *Science*, 235: 177-182 (1987)).

A la inversa, un cáncer que "no se caracteriza por la sobreexpresión de un receptor ErbB" es un cáncer que, en un

ensayo de diagnóstico, no expresa unos niveles mayores que los niveles normales de receptores ErbB, comparado con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido.

Un cáncer "independiente de hormonas" es un cáncer cuya proliferación no depende de la presencia de una hormona que se une a un receptor expresado por las células en el cáncer. Estos cánceres no sufren una regresión clínica después de la administración de estrategias farmacológicas o quirúrgicas que reducen la concentración de hormonas en el tumor o cerca del tumor. Los ejemplos de cánceres independientes de hormonas incluyen cáncer de próstata independiente de andrógenos, cáncer de mama independiente de estrógenos, cáncer endometrial y cáncer de ovario. Estos cánceres pueden comenzar como tumores dependientes de hormonas y avanzar desde un estadio sensible a hormonas hasta un tumor refractario a hormonas después de una terapia antihormonal.

El término "anticuerpo" en la presente memoria se emplea en su sentido más amplio e incluye específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada.

El término "anticuerpo monoclonal" se emplea en la presente memoria para indicar un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades pequeñas. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen a un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden ser sintetizados sin contaminación por otros anticuerpos. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante algún método concreto. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante el método del hibridoma, descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EEUU n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bancos de anticuerpos de fagos, utilizando las técnicas describas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991); y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en la presente memoria incluyen específicamente los anticuerpos "quiméricos", en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada (patente de EEUU n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria incluyen anticuerpos primatizados que comprenden secuencias de unión al antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, monos cercopitecos, simios, etc.) y secuencias de la región constante humanas.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprende una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferiblemente su región variable o de unión al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de un fragmento o fragmentos de anticuerpos.

Un anticuerpo "intacto" es un anticuerpo que comprende una región variable de unión al antígeno, así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y dominios constantes de cadena pesada C_{H1}, C_{H2}, y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humanos) o sus variantes de secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor son reemplazados por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tenga la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región de marco (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentren en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más la actuación del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y generalmente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden 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 opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc),

generalmente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

Los anticuerpos anti-ErbB2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®]), tal como se describe en la tabla 3 de la patente de EEUU n.º 5.821.337; y los anticuerpos 520C9 humanizado (documento WO93/21319) y 2C4 humanizado, como que los que aparecen en la figura 6.

Las "funciones efectoras" de los anticuerpos se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen la unión a C1q; la citotoxicidad dependiente del complemento; la unión al receptor de Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); la fagocitosis; la infrarregulación de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden clasificarse en diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estos también pueden dividirse en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se denominan, , , , y , respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen al anticuerpo unido sobre una célula diana y después provocan la lisis de la célula diana. Las principales células para mediar en la ADCC, las células NK, solo expresan Fc RIII, mientras que los monocitos expresan Fc RI, Fc RII y Fc RIII. La expresión de FcR sobre células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-492 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tales como los descritos en las patentes de EEUU n.ºs 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBCM) y células asesinas naturales (NK). Como alternativa, o además, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes *et al.*, *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos Fc RIII y realizan la función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos, siendo preferidas las PMBC y las células NK. Las células efectoras pueden aislarse a partir de su fuente natural, por ejemplo, a partir de sangre o PMBC, tal como se describe en la presente memoria.

El término "receptor de Fc" o el término "FcR" se emplean para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es un FcR que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc RI, Fc RII y Fc RIII, que incluyen los variantes alélicos y las formas de corte y emplamen alternativo de estos receptores. Los receptores Fc RII incluyen Fc RIIA (un "receptor activador") y Fc RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor activador Fc RIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor Fc RIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina de inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase revisión M. en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcR se analizan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-492 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-341 (1995). El término "FcR" de la presente memoria incluye otros FcR, que incluyen los que se identificarán en el futuro. El término también incluyen el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.*, 117:587 (1976); y Kim *et al.*, *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

La "citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula para lisar una diana en presencia del complemento. La vía de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejada con un antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, según se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

Los "anticuerpos nativos" normalmente son glicoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, y el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados a intervalos regulares. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio

variable (V_H), seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene en un extremo un dominio variable (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos aminoácidos concretos forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

El término "variable", tal como se emplea en conexión con los anticuerpos, se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables de anticuerpos se diferencian mucho en secuencia entre los anticuerpos, y se emplean en la unión y la especificidad de cada anticuerpo concreto por su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones de marco (FR). Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada nativas comprenden cada uno cuatro FR, que en gran parte adoptan una configuración en lámina, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de lámina. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable", cuando se emplea en la presente memoria, se refiere a los restos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera, y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera, y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)). Los restos de "región de marco" o "FR" son los restos del dominio variable que son distintos a los restos de la región hipervariable, según se define en la presente memoria.

Un anticuerpo "aislado" es un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que pueden interferir con los usos de diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo estará purificado (1) hasta más del 95% en peso del anticuerpo, según se determina mediante el método de Lowry, y lo más preferiblemente en más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o internos mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, normalmente el anticuerpo aislado preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés, por ejemplo, antígeno ErbB2, es un anticuerpo capaz de unirse al antígeno con una afinidad suficiente de modo que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a una célula que expresa el antígeno y/o para el transporte dirigido de un citotóxico u otro agente quimioterapéutico, tal como un maitansinoide. Cuando el anticuerpo es un anticuerpo que se une a ErbB2, normalmente se une preferentemente a ErbB2, en oposición a otros receptores ErbB, y puede ser un anticuerpo que no presente reacción cruzada significativa con otras proteínas, tales como EGFR, ErbB3 o ErbB4. En estas realizaciones, el grado de unión del anticuerpo a estas proteínas que no son ErbB2 (por ejemplo, la unión de la superficie celular al receptor endógeno) será menor que 10%, según se determina mediante análisis de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). A veces, el anticuerpo anti-ErbB2 no presenta reacción cruzada significativa con la proteína *neu* de rata, por ejemplo, según se describe en Schecter *et al.*, *Nature*, 312:513 (1984); y Drebin *et al.*, *Nature*, 312:545-548 (1984).

A menos que se indique lo contrario, la expresión "anticuerpo monoclonal 4D5" (en inglés "monoclonal antibody 4D5" y "4D5 monoclonal antibody") se refiere a un anticuerpo que tiene restos de unión al antígeno del anticuerpo 4D5 murino o que se derivan del anticuerpo 4D5 murino. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 4D5 puede ser un anticuerpo monoclonal 4D5 murino (ATCC CRL 10463) o uno de sus variantes, tales como un anticuerpo 4D5 humanizado, que posea restos aminoácidos de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal 4D5 murino. Los ejemplos de anticuerpos 4D5 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) como en la patente de EEUU n.º 5.821.337, siendo preferido el anticuerpo 4D5 humanizado huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®).

Un anticuerpo que tiene una "característica biológica" de un anticuerpo indicado, tal como el anticuerpo monoclonal

denominado 4D5, es un anticuerpo que posee una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distingue de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno (por ejemplo, ErbB2). Por ejemplo, un anticuerpo con una característica biológica de 4D5 puede mostrar un efecto inhibitor del crecimiento sobre células que sobreexpresan ErbB2 de una manera que depende del nivel de expresión de ErbB2 y/o se une al mismo epítipo en el dominio extracelular de ErbB2 al que se une 4D5 (por ejemplo, que bloquea la unión del anticuerpo monoclonal 4D5 a ErbB2).

Un "agente inhibitor del crecimiento", cuando se emplea en la presente memoria, se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, en especial una célula cancerosa que expresa ErbB *in vitro* o *in vivo*. Así, el agente inhibitor del crecimiento puede ser un agente que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan ErbB en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el avance del ciclo celular (en un punto distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, y inhibidores de topo II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se desbordan hacia la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami *et al.* (WB Saunders, Filadelfia, 1995), en especial p. 13.

Los ejemplos de anticuerpos "inhibidores del crecimiento" son los anticuerpos que se unen a ErbB2 e inhiben el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan ErbB2. Los anticuerpos anti-ErbB2 inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de células de tumor de mama SK-BR-3 en cultivo celular en más del 20%, y preferiblemente en más del 50% (por ejemplo, de aproximadamente 50% a aproximadamente 100%) a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 g/ml, determinándose la inhibición del crecimiento seis días después de la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase la patente de EEUU n.º 5.677.171, expedida el 14 de octubre, 1997). El ensayo de inhibición del crecimiento de células SK-BR-3 se describe con más detalle en esta patente y a continuación. El anticuerpo inhibitor del crecimiento preferido es el anticuerpo monoclonal 4D5, por ejemplo, 4D5 humanizado.

Una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) que "induce la muerte celular" es una molécula que hace que una célula viable se convierta en no viable. La célula, en general, es una célula que expresa el receptor ErbB2, en especial si la célula sobreexpresa el receptor ErbB2. Preferiblemente, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas, próstata o 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 del complemento y células efectoras inmunológicas para distinguir la muerte celular inducida por la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Así, el ensayo para la muerte celular puede realizarse utilizando suero termoinactivado (es decir, en ausencia del complemento) y en ausencia de células efectoras inmunológicas. Para determinar si la molécula es capaz de inducir la muerte celular, puede evaluarse la pérdida de la integridad de las membranas mediante la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (véase Moore *et al.*, *Cytotechnology*, 17:1-11 (1995)) o 7AAD, con relación a las células no tratadas. Los anticuerpos inductores de la muerte celular preferidos son los anticuerpos que inducen la captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474. Los ejemplos de anticuerpos que inducen la muerte celular incluyen los anticuerpos anti-ErbB2 7C2 y 7F3 (documento WO 98/17797), que incluyen sus variantes humanizados y/o madurados por afinidad.

Una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) que "induce la apoptosis" es una molécula que induce la muerte celular programada, según se determina mediante la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, el encogimiento de las células, la dilatación del retículo endoplásmico, la fragmentación de las células y/o la formación de vesículas de membranas (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula normalmente es una célula que sobreexpresa el receptor ErbB2. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas, próstata o vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. Están disponibles diversos métodos para evaluar los acontecimientos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, puede medirse la translocación de la fosfatidil serina (PS) mediante la unión de anexina; la fragmentación del ADN puede evaluarse mediante la formación de escaleras de ADN; y la condensación de cromatina/nuclear, junto con la fragmentación del ADN, puede evaluarse mediante un aumento en las células hipodiploides. Preferiblemente, la molécula que induce la apoptosis es una molécula que produce un aumento en aproximadamente 2 a 50 veces, preferiblemente en aproximadamente 5 a 50 veces, y lo más preferiblemente en aproximadamente 10 a 50 veces de la inducción de la unión de anexina, con relación a una célula no tratada en un ensayo de unión de anexina que emplea células BT474. A veces, la molécula preapoptótica será una molécula que también bloquea la activación por ligando de ErbB de un receptor ErbB. En otras situaciones, la molécula es una molécula que no bloquea significativamente la activación por ligando de ErbB de un receptor ErbB. Además, la molécula puede inducir la apoptosis, sin inducir una gran reducción en el porcentaje de células en fase S (por ejemplo, una molécula que solo induce aproximadamente 0-10% de reducción en el porcentaje de estas células con relación a un control). Los ejemplos de anticuerpos que

inducen la apoptosis incluyen los anticuerpos anti-ErbB2 7C2 y 7F3 (documento WO 98/17797), que incluyen sus variantes humanizados y/o madurados por afinidad.

Un anticuerpo que "bloquea" la activación por ligando de un receptor ErbB es un anticuerpo que reduce o previene dicha activación, tal como se describió anteriormente en la presente memoria, en el que el anticuerpo es capaz de bloquear la activación por ligando del receptor ErbB de una manera sustancialmente más eficaz que el anticuerpo monoclonal 4D5, por ejemplo, de una manera aproximadamente tan eficaz como los anticuerpos monoclonales 7F3 o 2C4 o sus fragmentos Fab, y preferiblemente de una manera aproximadamente tan eficaz como el anticuerpo monoclonal 2C4 o sus fragmentos Fab. Por ejemplo, el anticuerpo que bloquea la activación por ligando de un receptor ErbB puede ser un anticuerpo que sea aproximadamente 50-100% más eficaz que 4D5 para bloquear la formación de un heterooligómero de ErbB. El bloqueo de la activación por ligando de un receptor ErbB puede producirse por cualquier medio, por ejemplo, interfiriendo con la unión del ligando a un receptor ErbB, la formación de complejos de ErbB, la actividad tirosina quinasa de un receptor ErbB en un complejo de ErbB y/o la fosforilación de un resto o restos tirosina quinasa en el receptor ErbB o por un receptor ErbB. Los ejemplos de anticuerpos que bloquean la activación por ligando de un receptor ErbB incluyen los anticuerpos monoclonales 2C4 y 7F3 (que bloquean la activación por HRG de los heterooligómeros ErbB2/ErbB3 y ErbB2/ErbB4; y la activación por EGF, TGF- α , anfirregulina, HB-EGF y/o epirregulina de un heterooligómero EGFR/ErbB2); y los anticuerpos L26, L96 y L288 (Klapper *et al.*, *Oncogene*, 14:2099-2109 (1997)), que bloquean la unión de EGF y NDF a células T47D que expresan EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4. Dentro de las definiciones se incluyen específicamente los variantes humanizados y/o madurados por afinidad de estos y otros anticuerpos.

El término "epitopo" se emplea para referirse a los sitios de unión para anticuerpos (monoclonales o policlonales) sobre antígenos de proteínas.

Los anticuerpos que se unen a cierto epitopo se identifican mediante "cartografiado de epitopos". Existen muchos métodos conocidos en la técnica para el cartografiado y la caracterización de la localización de epitopos sobre proteínas, que incluyen resolver la estructura cristalina de un complejo de antígeno-anticuerpo, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmentos génicos, y ensayos basados en péptidos sintéticos, según se describe, por ejemplo, en el capítulo 11 de Harlow y Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. Los ensayos de competición se analizan a continuación. Según los ensayos de expresión de fragmentos génicos, el marco de lectura abierto que codifica la proteína se fragmenta de modo aleatorio o mediante construcciones genéticas específicas, y se determina la reactividad de los fragmentos expresados de la proteína con el anticuerpo que se va a ensayar. Los fragmentos génicos, por ejemplo, pueden producirse mediante PCR y después transcribirse y traducirse en la proteína *in vitro*, en presencia de aminoácidos radiactivos. Después se determina la unión del anticuerpo a los fragmentos de proteínas marcados de modo radiactivo mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel. Ciertos epitopos también pueden identificarse utilizando grandes bancos de secuencias de péptidos aleatorias mostradas sobre la superficie de partículas de fagos (bancos de fagos). Como alternativa, puede ensayarse un banco definido de fragmentos de péptidos solapantes para la unión a un anticuerpo de ensayo en ensayos de unión simples. Esta última estrategia es adecuada para definir epitopos lineales de aproximadamente 5 a 15 aminoácidos.

Un anticuerpo se une "fundamentalmente al mismo epitopo" que un epitopo de referencia cuando los dos anticuerpos reconocen epitopos idénticos o estéricamente solapantes. Los métodos más rápidos y que más ampliamente se utilizan para determinar si dos epitopos se unen a epitopos idénticos o estéricamente solapantes son los ensayos de competición, que pueden configurarse en toda una serie de diferentes formatos, utilizando un antígeno marcado o un anticuerpo marcado. Normalmente, el antígeno se inmoviliza sobre una placa de 96 pocillos, y se mide la capacidad de los anticuerpos no marcados para bloquear la unión de los anticuerpos marcados utilizando marcadores radiactivos o enzimáticos.

El "epitopo 4D5" es la región en el dominio extracelular de ErbB2 a la cual se une el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463). Este epitopo está cerca del dominio transmembrana de ErbB2, y se extiende desde aproximadamente el resto 519 a aproximadamente el resto 625, ambos inclusive, dentro de la secuencia del dominio extracelular de ErbB2 incluida en SEQ ID NO:3, figura 4. Para seleccionar anticuerpos que se unen al epitopo 4D5 puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado habitual, tal como el descrito en Harlow y Lane, *supra*. Como alternativa, puede realizarse un cartografiado de epitopos para evaluar si el anticuerpo se une al epitopo 4D5 de ErbB2 (por ejemplo, cualquier resto o restos en la región desde aproximadamente el resto 529 a aproximadamente el resto 625, ambos inclusive, en SEQ ID NO:3).

El "epitopo 3H4" es la región en el dominio extracelular de ErbB2 a la cual se une el anticuerpo 3H4. Este epitopo incluye los restos desde aproximadamente 541 hasta aproximadamente 599, ambos inclusive, en la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de ErbB2 (véase la figura 4 y SEQ ID NO:3).

El "epitopo 7C2/7F3" es la región en el N-terminal del dominio extracelular de ErbB2 a la cual se unen los anticuerpos 7C2 y 7F3 (cada uno depositado en ATCC, véase a continuación). Para seleccionar anticuerpos que se unen al epitopo 7C2/7F3, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado habitual, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse un cartografiado de epitopos para establecer si el anticuerpo se une al epitopo 7C2/7F3

sobre ErbB2 (por ejemplo, cualquier resto o restos en la región desde aproximadamente el resto 22 a aproximadamente el resto 53 de ErbB2; véase la figura 4, y SEQ ID NO:3).

Un tumor que "no responde, o responde muy mal, a un tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-ErbB" no muestra una mejora estadísticamente significativa en respuesta a un tratamiento con un anticuerpo anti-ErbB, cuando se compara con no recibir tratamiento o con un tratamiento con placebo en un modelo animal reconocido o un ensayo clínico humano, o que responde a un tratamiento inicial con anticuerpos anti-ErbB pero que crece a medida que continúa el tratamiento. Un modelo animal particularmente adecuado para ensayar la eficacia de anticuerpos anti-ErbB es el modelo de animales transgénicos descrito en la presente memoria e ilustrado en el ejemplo 3.

Los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren al tratamiento terapéutico y profiláctico o a medidas preventivas, en los que el objetivo es prevenir o frenar (disminuir) un trastorno o cambio fisiológico no deseado, tal como el desarrollo o la propagación de un cáncer. Para los objetivos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan al alivio de los síntomas, la disminución de la extensión de la enfermedad, un estado estabilizado (es decir, que no empeora) de la enfermedad, el retraso o el freno del avance de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado de enfermedad, y la remisión (parcial o total), detectable o no detectable. Un "tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia, comparado con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno o la afección, así como los propensos a padecer el trastorno o la afección, o aquellos en los que debe prevenirse el trastorno o la afección.

Un "trastorno" es cualquier afección que podría beneficiarse de un tratamiento de la presente invención. Esto incluye enfermedades o trastornos crónicos y agudos, que incluyen las condiciones patológicas que predisponen a un mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que van a ser tratados con la presente incluyen tumores benignos y malignos; leucemias y malignidades linfoides, en particular cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas, próstata o vejiga. Un trastorno preferido que va a ser tratado según la presente invención es un tumor maligno, tal como cáncer de mama, que sobreexpresa un receptor ErbB (por ejemplo, ErbB2 y/o EGFR), y que no responde, o responde muy mal, a un tratamiento con un anticuerpo contra el receptor o receptores que están sobreexpresados. Un trastorno particularmente preferido es un cáncer de mama que sobreexpresa ErbB2 que no responde, o responde muy mal, a una terapia con HERCEPTIN®.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco que es eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; puede reducir el tamaño del tumor; puede inhibir (es decir, frenar en alguna medida y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas hacia órganos periféricos; puede inhibir (es decir, frenar en alguna medida y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; puede inhibir, en alguna medida, el crecimiento tumoral; y/o puede aliviar en alguna medida uno o más síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, este puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia puede medirse, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta el avance de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR).

El término "agente citotóxico", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen sus fragmentos y/o variantes.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; gases mostaza, tales como clorambucilo, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como aclacinomisininas, actinomicina, azaserina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomycin, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; antiadrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores del ácido fólico, tales como ácido frolínico; aceglatona;

aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfomitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2'-triclortrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del 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; el inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

El término "profármaco", tal como se emplea en esta solicitud, se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica hacia las células tumorales, cuando se compara con el fármaco de origen, y que es capaz de ser enzimáticamente activado o convertido en la forma de origen más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", *Biochemical Society Transactions*, 14, págs. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986); y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.* (ed.), págs. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos incluyen, pero no se limitan a profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida, o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco incluyen, pero no se limitan a los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

El término "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, cuando resulte apropiado, ácido ribonucleico (ARN). La expresión también incluye, como equivalentes, análogos de ADN o ARN preparados a partir de análogos de nucleótidos, y según sea aplicable, polinucleótidos monocatenarios (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 normalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta de la que tiene la forma o el emplazamiento en los que encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácidos nucleicos aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el anticuerpo en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. El término "vector de expresión" incluye plásmidos, cósmidos o fagos capaces de sintetizar la proteína HER2 concreta codificada por el respectivo gen recombinante portado por el vector. Los vectores preferidos son los vectores capaces de una replicación autónoma y/o de la expresión de los ácidos nucleicos a los que están unidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se emplean de modo intercambiable, puesto que el plásmido es la forma de vector que se emplea de modo más habitual.

Tal como se emplean en la presente memoria, los términos "elementos reguladores de la transcripción" y "secuencias reguladoras de la transcripción" se emplean de modo intercambiable y se refieren a las secuencias de un ácido nucleico, por ejemplo, ADN, necesarias para la expresión de una secuencia codificadora unida operablemente en un organismo hospedante concreto. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores, señales de corte y empalme, y señales de poliadenilación. Estos términos y expresiones pretenden incluir todos los elementos que estimulan o regulan la transcripción, que incluyen promotores, elementos de núcleo requeridos para la interacción básica de la ARN polimerasa y los factores de transcripción, elementos cadena arriba, potenciadores, y elementos de respuesta (Lewin, "Genes V" (Oxford University Press, Oxford), págs. 847-873). La referencia en la presente memoria a los elementos reguladores de la transcripción de un gen o una clase de genes incluye los elementos reguladores de la transcripción completos que aparecen en la naturaleza o una región intacta de estos, y las formas modificadas de los elementos reguladores de la transcripción del gen o grupo de genes. Estas formas modificadas incluyen la redistribución de los elementos, delecciones de algunos elementos o secuencias irrelevantes, y la inserción de elementos heterólogos. La naturaleza modular de los elementos reguladores de la transcripción y la ausencia de

dependencia de la posición de la función de algunos elementos reguladores, tales como potenciadores, hacen posibles estas modificaciones. Están disponibles numerosas técnicas para diseccionar los elementos reguladores de genes para determinar su localización y función. Esta información puede utilizarse para dirigir la modificación de los elementos, si se desea. Sin embargo, se prefiere utilizar una región intacta de los elementos reguladores de la transcripción de un gen.

El término "promotor específico de tejido" significa una secuencia de nucleótidos que actúa como promotor, es decir, regula la expresión de una secuencia de ADN seleccionada unida operablemente al promotor, y que realiza la expresión de la secuencia de ADN seleccionada en células específicas de un tejido, tales como células de una glándula mamaria. En un caso, pueden utilizarse construcciones de genes que emplean promotores específicos de glándula mamaria y que dirigen preferentemente la expresión de una proteína de HER2 o de un fragmento de la proteína en el tejido de glándula mamaria.

Un ácido nucleico está "unido operablemente" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un ADN para una presecuencia o conductor de la secreción está unido operablemente al ADN para un polipéptido, si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operablemente a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operablemente a una secuencia codificadora si está colocado de forma que se facilite la traducción. En general, "unido operablemente" significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de un conductor de la secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores estén contiguos. La unión se realiza mediante acoplamiento en sitios de restricción convenientes. Si estos sitios no existen, se emplean conectores o adaptadores oligonucleotídicos sintéticos según la práctica convencional.

El término "transfección" se refiere a la introducción de un ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, en una célula receptora mediante transferencia de genes mediada por ácido nucleicos. Una "transformación", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a un proceso en el que el genotipo de una célula cambia como resultado de la captación celular de ADN o ARN exógeno y, por ejemplo, la célula transformada expresa una forma recombinante de HER2.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "transgén" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es parcial o totalmente heteróloga, es decir, extraña, para la célula o el animal transgénico en la que se introduce, o es homóloga con un gen endógeno de la célula o el animal transgénico en la que se introduce, pero está diseñada para ser insertada, o se inserta en el genoma del animal de tal forma que altera el genoma de la célula en la que se inserta (por ejemplo, se inserta en una localización diferente de la del gen natural o su inserción da como resultado una inactivación). Un transgén puede estar unido operablemente a una o más secuencias reguladoras de la transcripción y cualquier otro ácido nucleico, tales como intrones, que puedan ser necesarios para la expresión óptima de un ácido nucleico seleccionado.

Por consiguiente, el término "construcción de transgén" se refiere a un ácido nucleico que incluye un transgén, y (opcionalmente) otras secuencias de ácidos nucleicos, tales como una secuencia reguladora de la transcripción, sitios de poliadenilación, orígenes de la replicación, genes marcadores, etc., que puedan ser útiles en la manipulación general del transgén para la inserción en el genoma de un organismo hospedante.

El término "transgénico" se emplea en la presente memoria como un adjetivo para describir la propiedad, por ejemplo, de un animal o una construcción, de alojar un transgén. Por ejemplo, tal como se emplea en la presente memoria, un "organismo transgénico" es cualquier animal, preferiblemente un mamífero no humano, en el que una o más de las células del animal contiene un ácido nucleico heterólogo introducido por medio de la intervención humana, tal como mediante técnicas transgénicas muy conocidas en la técnica. El ácido nucleico se introduce en la célula, directa o indirectamente, mediante la introducción en un precursor de la célula, mediante manipulación genética deliberada, tal como mediante microinyección o mediante infección con un virus recombinante. El término "manipulación genética" no incluye el cruzamiento clásico, o la fertilización *in vitro*, sino que se dirige a la introducción de una molécula de ADN recombinante. Esta molécula puede integrarse dentro de un cromosoma, o puede ser ADN de replicación extracromosómica. En los animales transgénicos típicos descritos en la presente memoria, el transgén provoca que las células expresen o sobreexpresen una forma recombinante de proteínas de HER2 concretas. Las expresiones "línea fundadora" y "animal fundador" se refieren a los animales que son el producto maduro de los embriones a los que se añadió el transgén, es decir, los animales que han crecido a partir de los embriones en los que se insertó el ADN, y que fueron implantados en uno o más hospedantes sustitutos.

El término "progenie" y la expresión "progenie del animal transgénico" se refieren a cualquiera y toda la descendencia de cada generación posterior a los mamíferos que fueron originariamente transformados. El término "mamífero no humano" se refiere a todos los miembros de la clase Mammalia, excepto los seres humanos. Un "mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, que incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como un ratón, rata, conejo, cerdo, oveja, cabra, ganado vacuno y primates superiores.

Tal como se emplea en la presente memoria, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se emplean

de modo intercambiable y todas estas denominaciones incluyen la progenie. Así, el término "transformantes" y la expresión "células transformadas" incluyen las células concretas primarias y los cultivos derivados de ellas independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido en ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la seleccionada en la célula originariamente transformada. Cuando se pretendan denominaciones diferenciadas, estas serán evidentes a partir del contexto.

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para administrar un fármaco (tal como los anticuerpos anti-ErbB2 descritos en la presente memoria y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma están dispuestos habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas.

El término "inserto en el envase" se emplea para referirse a las instrucciones que se incluyen habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, utilización, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias acerca del uso de dichos productos terapéuticos.

Un "cardioprotector" es un compuesto o una composición que previene o reduce la disfunción miocárdica (es decir, cardiomiopatía y/o insuficiencia cardíaca congestiva) asociada con la administración de un fármaco, tal como un anticuerpo anti-ErbB o su conjugado con maitansinoide, a un paciente. El cardioprotector, por ejemplo, puede bloquear o reducir un efecto cardiotoxico mediado por radicales libres y/o prevenir o reducir las lesiones de estrés oxidativo. Los ejemplos de cardioprotectores incluidos en la presente definición incluyen el agente quelante de hierro dextrazoxano (ICRF-187) (Seifert *et al.*, *The Annals of Pharmacotherapy*, 28:1063-1072 (1994)); un agente de disminución de lípidos y/o antioxidante, tal como probucol (Singal *et al.*, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 27:1055-1063 (1995)); amifostina (éster 2-[(3-aminopropil)amino]etantiol-dihidrógeno fosfato de aminotiol, también denominado WR-2721, y su forma de captación celular desfosforilada denominada WR-1065) y ácido S-3-(3-metilaminopropilamino)propilfosforotioico (WR-151327), véase Green *et al.*, *Cancer Research*, 54:738-741 (1994); digoxina (Bristow, M.R., en: Bristow M.R., ed., *Drug-Induced Heart Disease*, Nueva York, Elsevier, 191-215 (1980)); beta-bloqueantes, tales como metoprolol (Hjalmarson *et al.*, *Drugs*, 47, supl. 4:31-39 (1994); y Shaddy *et al.*, *Am. Heart J.*, 129:197-9 (1995)); vitamina E; ácido ascórbico (vitamina C); captadores de radicales libres, tales como ácido oleanólico, ácido ursólico y N-acetilcisteína (NAC); compuestos de atrapamiento de espín, tales como alfa-fenil-terc-butil nitrona (PBN); (Paracchini *et al.*, *Anticancer Res.*, 13:1607-1612 (1993)); compuestos seleno-orgánicos, tales como P251 (Elbesen); y similares.

2. Descripción detallada

La presente invención se basa en los resultados obtenidos en un nuevo modelo de tumor HER2-transgénico murino en el que HERCEPTIN®, o el anticuerpo murino 4D5 del cual se deriva HERCEPTIN®, tiene poco efecto sobre el crecimiento tumoral. Utilizando este modelo para ensayar la eficacia de HERCEPTIN® y de conjugados de HERCEPTIN®-maitansinoide, se descubrió, de modo sorprendente, que aunque el tumor transplantado obtenido de dichos ratones transgénicos responde mal al tratamiento con HERCEPTIN®, los conjugados de HERCEPTIN®-maitansinoide son muy eficaces.

A. Producción de anticuerpos anti-ErbB

A continuación se ofrece una descripción de ejemplos de técnicas para la producción de los anticuerpos utilizados según la presente descripción. La producción de anticuerpos se ilustrará haciendo referencia a anticuerpos anti-ErbB2, pero será evidente para los expertos en la técnica que pueden producirse anticuerpos contra otros miembros de la familia del receptor ErbB y modificarse de una manera similar.

El antígeno de ErbB2 que se va a utilizar para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de ErbB2 o una de sus porciones, que contenga el epitopo deseado. Como alternativa, pueden utilizarse células que expresan ErbB2 sobre la superficie celular (por ejemplo, células NIH-3T3 transformadas para que sobreexpresen ErbB2; o una línea celular de carcinoma, tal como células SK-BR-3, véase Stancovski *et al.*, *PNAS (USA)*, 88:8691-8695 (1991)) para generar anticuerpos. Otras formas de ErbB2 útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

(i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales preferiblemente se generan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con una proteína que sea inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o un inhibidor de tripsina de soja, empleando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂, o R¹N=C=NR, en el que R y R¹ son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, los conjugados inmunogénicos o los derivados combinando, por

- ejemplo, 100 g o 5 g de la proteína o el conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales reciben un refuerzo de 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante una inyección subcutánea en múltiples sitios. De 7 a 14 días después, los animales se sangran y el suero se ensaya para la titulación de anticuerpos. Los animales reciben un refuerzo hasta que la titulación alcanza un valor de meseta. Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de entrecruzamiento diferente. Los conjugados también pueden prepararse en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, de forma adecuada, se emplean agentes agregantes, tales como alumbre, para potenciar la respuesta inmunológica.
- 5 (ii) *Anticuerpos monoclonales*
- Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en pequeñas cantidades. Así, el adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos discretos.
- 15 Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (patente de EEUU n.º 4.816.567).
- En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedante apropiado, tal como un hámster, se inmuniza tal como se describió anteriormente en la presente memoria, para inducir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos después se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).
- 20 Las células de hibridomas preparadas de esta forma se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma de origen no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma de origen carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), evitando estas sustancias el crecimiento de células deficientes en HGPRT.
- 25 Las células de mieloma preferidas son las células que se fusionan con eficacia, mantienen una producción estable de alto nivel del anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Entre estas, las líneas de células de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11, disponibles en the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EEUU, y células SP-2 o X63-Ag8-653 cells, disponibles en the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EEUU. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); y Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).
- 30 El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).
- 35 La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede ser determinada, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).
- 40 Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.
- 45 Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se separan de modo adecuado del medio de cultivo, fluido de ascitis, o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.
- 50 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla con facilidad y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas oligonucleotídicas que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma actúan como

fente preferida de dicho ADN. Tras haber sido aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresi3n, que despu3s se transfectan en c3lulas hospedantes, tales como c3lulas de *E. coli*, c3lulas COS de simio, c3lulas de ovario de hámster chino (CHO), o c3lulas de mieloma que, en otros casos, no producen prote3nas de anticuerpos, para obtener la s3ntesis de anticuerpos monoclonales en las c3lulas hospedantes recombinantes. Los art3culos cient3ficos sobre la expresi3n recombinante de ADN que codifica el anticuerpo en bacterias incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opin. in Immunol.*, 5:256-262 (1993); y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

En otro caso, pueden aislarse anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos a partir de bancos de fagos de anticuerpos utilizando las t3cnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bancos de fagos. Posteriores publicaciones han descrito la producci3n de anticuerpos humanos de alta afinidad (en el intervalo de nM) mediante barajado de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), as3 como mediante infecci3n combinatoria y recombinaci3n *in vivo* como una estrategia para construir bancos de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). As3, estas t3cnicas son alternativas viables a las t3cnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN tambi3n puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificadora por dominios constantes de cadena pesada y de cadena ligera, en lugar de las secuencias murinas hom3logas (patente de EEUU n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o mediante la uni3n covalente a la secuencia codificadora de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificadora para un polip3ptido que no es una inmunoglobulina.

Generalmente, estos polip3ptidos que no son inmunoglobulinas tienen una sustituci3n de los dominios constantes de un anticuerpo, o tienen una sustituci3n de los dominios variables de un sitio de uni3n al ant3geno de un anticuerpo, para crear un anticuerpo bivalente quim3rico que comprende un sitio de uni3n al ant3geno que tiene especificidad por un ant3geno y otro sitio de uni3n al ant3geno que tiene especificidad por un ant3geno diferente.

(iii) Anticuerpos humanizados

En la t3cnica se han descrito m3todos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o m3s restos amino3cidos introducidos en 3l a partir de una fuente que es no humana. Estos restos amino3cidos no humanos a menudo se denominan restos "de importaci3n", y se obtienen generalmente de un dominio variable "de importaci3n". La humanizaci3n puede realizarse fundamentalmente siguiendo el m3todo de Winter *et al.* (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias de la regi3n hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, estos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quim3ricos (patente de EEUU n.º 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la pr3ctica, los anticuerpos humanizados generalmente son anticuerpos humanos en los que algunos restos de la regi3n hipervariable y probablemente algunos restos de FR est3n sustituidos por restos de sitios an3logos en anticuerpos de roedor.

La elecci3n de los dominios variables humanos, tanto de cadena ligera como de cadena pesada, para ser utilizados para preparar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Seg3n el m3todo denominado "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se selecciona frente al banco completo de secuencias de dominios variables humanos conocidas. La secuencia humana que es m3s parecida a la del roedor entonces se acepta como la regi3n de marco (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro m3todo emplea una regi3n de marco concreta derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede utilizarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Tambi3n es importante que los anticuerpos que se van a humanizar mantengan una alta afinidad por el ant3geno y otras propiedades biol3gicas favorables. Para lograr este objetivo, seg3n un m3todo preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de an3lisis de las secuencias de origen y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias de origen y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulinas tridimensionales est3n disponibles con facilidad y son conocidos por los expertos en la t3cnica. Est3n disponibles programas inform3ticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. El estudio de estos modelos permite el an3lisis del papel probable que desempeñan los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el an3lisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata a unirse a su ant3geno. De esta forma, pueden seleccionarse y combinarse restos de FR procedentes de secuencias del receptor y de importaci3n, de modo que se logra la caracter3stica del anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el ant3geno o ant3genos diana. En general, los restos de la regi3n hipervariable est3n implicados directamente, y de modo m3s sustancial, en influir en la uni3n al ant3geno.

El siguiente ejemplo 1 describe la producción de un ejemplo de anticuerpo anti-ErbB2 humanizado. El anticuerpo humanizado en la presente memoria puede comprender, por ejemplo, restos de la región hipervariable no humana incorporados en un dominio pesado variable humano, y también puede comprender una sustitución de la región de marco (FR) en una posición seleccionada del grupo que consiste en 69H, 71H y 73H utilizando el sistema de numeración de dominios variables indicado en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). En un caso, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de FR en dos o todas las posiciones 69H, 71H y 73H.

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como Fab. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

(iv) Anticuerpos humanos

Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, tras una inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógena. Por ejemplo, se ha indicado que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (J_H) de un anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógena. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humanos en estos ratones mutantes de línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y las patentes de EEUU n.ºs 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

Como alternativa, puede utilizarse la tecnología de presentación de fagos (McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulinas a partir de donantes no inmunizados. Según esta técnica, se clonan genes del dominio V de anticuerpos dentro de marco en el gen de la proteína de la envuelta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra estas propiedades. Así, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación de fagos puede realizarse en una diversidad de formatos; para un análisis, véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology*, 3:564-571 (1993). Pueden utilizarse varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación de fagos. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos antioxazolona a partir de un pequeño banco combinatorio aleatorio de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V procedentes de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos contra una serie diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo fundamentalmente las técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), o Griffith *et al.*, *EMBO J.*, 12:725-734 (1993). Véanse también las patentes de EEUU n.ºs 5.565.332 y 5.573.905.

Tal como se analizó anteriormente, las células B activadas *in vitro* también pueden generar anticuerpos humanos (véanse las patentes de EEUU n.ºs 5.567.610 y 5.229.275).

Se describen anticuerpos anti-ErbB2 humanos en la patente de EEUU n.º 5.772.997, expedida el 30 de junio, 1998, y el documento WO 97/00271, publicado el 3 de enero, 1997.

(v) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se han obtenido a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente por células hospedantes recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse a partir de los bancos de fagos de anticuerpos analizados anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH directamente de *E. coli* y acoplarse de modo químico para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, pueden aislarse fragmentos F(ab')₂ directamente de un cultivo de células hospedantes recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica. En otros casos, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de EEUU n.º 5.571.894; y la patente de EEUU n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, según se describe en la patente de EEUU n.º 5.641.870, por ejemplo. Estos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epitopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epitopos diferentes de la proteína ErbB2. Otros anticuerpos de este tipo pueden combinar un sitio de unión a ErbB2 con un sitio o sitios de unión a EGFR, ErbB3 y/o ErbB4. Como alternativa, un brazo anti-ErbB2 puede combinarse con un brazo que se une a una molécula activadora sobre un leucocito, tal como una molécula de receptor de células T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores de Fc para for IgG (Fc R), tales como Fc RI (CD64), Fc RII (CD32) y Fc RIII (CD16) para enfocar los mecanismos de defensa celulares hacia la célula que expresa ErbB2. Los anticuerpos biespecíficos también pueden utilizarse para transportar agentes citotóxicos a las células que expresan ErbB2. El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-Fc RIII, y la patente de EEUU n.º 5.837.234 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-Fc RI. Un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fc se muestra en el documento WO 98/02463. La patente de EEUU n.º 5.821.337 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

En la técnica se conocen métodos para la preparación de anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es algo incómoda, y los rendimientos del producto son bajos. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991). Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de unión al antígeno-anticuerpo) se condensan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulinas. La fusión preferiblemente se realiza con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera esté presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulinas y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo hospedante adecuado. Esto proporciona una mayor flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en los casos en los que proporciones no iguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificadoras de dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en proporciones iguales produzca unos rendimientos altos o cuando las proporciones no tengan una importancia particular.

En un caso preferido de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, puesto que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Esta estrategia se describe en el documento WO 94/04690. Para otros detalles para la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Según otra estrategia descrita en la patente de EEUU n.º 5.731.168, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos puede modificarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo son reemplazadas por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar al de la cadena o cadenas laterales más grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos son rotos proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados después se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB después se reconvierte en el FAB'-tiol mediante una reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Avances recientes han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden ser acoplados de modo químico para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)

describen la producción de una molécula $F(ab')_2$ de anticuerpo biespecífico completamente humanizada. Cada fragmento Fab' es segregado por separado desde *E. coli* y sometido a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera es capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y a células T humanas normales, así como puede activar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de un cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina (Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un conector que es demasiado corto para permitir un apareamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento son obligados a aparearse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando con ello dos sitios de unión al antígeno. También se ha descrito otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (scFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos (Tutt *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 60 (1991)).

(vii) Otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos

Se contempla la modificación o modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti-ErbB2 descritos en la presente memoria. Por ejemplo, puede resultar deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Los variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-ErbB2 se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo anti-ErbB2, o mediante síntesis peptídica. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-ErbB2. Se realiza cualquier combinación de delecciones, inserciones y sustituciones para conseguir la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo anti-ErbB2, tal como alterar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo anti-ErbB2 que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina", según se describe en Cunningham y Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989). En este método, se identifica un resto o un grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido con carga neutra o negativa (lo más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno ErbB2. Las localizaciones de aminoácidos que muestran sensibilidad funcional frente a las sustituciones después se refinan mediante la introducción de otros variantes en los sitios de sustitución. Así, aunque el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación *per se* esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar la actuación de una mutación en un sitio concreto se realiza un barrido de ala o una mutagénesis aleatoria en el codón o región diana, y se seleccionan los variantes de anticuerpos anti-ErbB2 expresados para la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones dentro de la secuencia de un único o de múltiples restos aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo anti-ErbB2 con un resto metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otros variantes de inserción de la molécula de anticuerpo anti-ErbB2 incluyen la fusión al N- o C-terminal del anticuerpo anti-ErbB2 de una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida sérica del anticuerpo.

Otro tipo de variante es un variante de sustitución de aminoácidos. Estos variantes tienen al menos un resto aminoácido en la molécula del anticuerpo anti-ErbB2 reemplazado por un resto 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 preferidas". Si estas sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "Ejemplos de sustituciones" en la tabla 1, o como se describe más a fondo a continuación con respecto a las clases de aminoácidos, y los productos pueden seleccionarse.

Tabla 1

Resto original	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	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

Se logran unas modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que se diferencien significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal; (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o (c) la voluminosidad de la cadena lateral. Los restos que aparecen en la naturaleza se dividen en grupos basados en sus propiedades comunes de la cadena lateral:

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

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

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implican el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier resto cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo anti-ErbB2 también puede sustituirse, en general por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento aberrante. A la inversa, pueden añadirse uno o más enlaces cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (en particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

Un tipo de variante de sustitución particularmente preferido implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo de origen (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, el variante o variantes resultantes seleccionados para un posterior desarrollo tendrán mejores propiedades biológicas con relación al anticuerpo de origen a partir del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichos variantes de sustitución implica una maduración por afinidad utilizando la presentación de fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los variantes de anticuerpos generados de esta manera se presentan de una manera monovalente en partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 encapsulado dentro de cada partícula. Los variantes presentados por fagos después se seleccionan para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión), tal como se describe en la presente memoria. Para identificar candidatos de sitios de la región hipervariable para su modificación puede realizarse una mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o además, puede resultar beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el ErbB2 humano. Estos restos de contacto y los restos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en la presente memoria. Tras haber generado estos variantes, el panel de variantes se somete a una selección según se describe en la presente memoria, y pueden seleccionarse anticuerpos con mejores propiedades en uno o más ensayos pertinentes para su posterior desarrollo.

Puede resultar deseable modificar el anticuerpo utilizando en la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígenos (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. Como alternativa, o además, pueden introducirse uno o más restos cisteína en la región Fc, permitiendo con ello la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta forma puede tener mejor capacidad de internalización y/o una mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y de muerte celular mediada por el complemento. Véase Caron *et al.*, *J. Exp Med.*, 176:1191-1195 (1992), y Shopes, B., *J. Immunol.*, 148:2918-2922 (1992). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con mayor actividad antitumoral utilizando entrecruzadores heterobifuncionales, según se describe en Wolff *et al.*, *Cancer Research*, 53:2560-2565 (1993). Como alternativa, un anticuerpo puede modificarse para que tenga regiones Fc duales y, así, puede tener mayores capacidades de ADCC y de lisis de complemento. Véase Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989).

Para aumentar la semivida sérica del anticuerpo se puede incorporar un epitopo de unión al receptor de salvamento en el anticuerpo (de modo específico, un fragmento de anticuerpo) según se describe en la patente de EEUU n.º 5.739.277, por ejemplo. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "epitopo de unión al receptor de salvamento" se refiere a un epitopo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida sérica *in vivo* de la molécula de IgG.

(viii) Variantes de glicosilación

Los anticuerpos se glicosilan en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, *Chem. Immunol.*, 65:111-128 (1997); Wright y Morrison, *TibTECH*, 15:26-32 (1997)). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd *et al.*, *Mol. Immunol.*, 32:1311-1318 (1996); Wittwe y Howard, *Biochem.*, 29:4175-4180 (1990)), y a la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína que puede afectar a la conformación y la superficie tridimensional presentada de la glicoproteína (Hefferis y Lund, *supra*; Wyss y Wagner, *Current Opin. Biotech.*, 7:409-416 (1996)). Los oligosacáridos también pueden actuar para transportar una glicoproteína concreta hasta ciertas moléculas basándose en estructuras de reconocimiento específicas. Por ejemplo, se ha indicado que, en IgG agalactosilado, el resto oligosacárido "se voltea" hacia fuera del espacio inter-CH2 y los restos N-acetilglucosamina terminales se hacen disponibles para unirse a la proteína de unión a manosa (Malhotra *et al.*, *Nature Med.*, 1:237-243 (1995)). La eliminación por glicopeptidasa de los oligosacáridos de CAMPATH-1H (un anticuerpo IgG1 monoclonal murino humanizado recombinante que reconoce el antígeno CDw52 de linfocitos humanos) producido en células de ovario de hámster chino (CHO) produce una reducción completa en la lisis mediada por el complemento (CMCL) (Boyd *et al.*, *Mol. Immunol.*, 32:1311-1318 (1996)), mientras que la eliminación selectiva de restos ácido siálico utilizando neuraminidasa no produce pérdida de DMCL. También se ha indicado que la glicosilación de anticuerpos afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se ha indicado que células CHO con expresión regulada por tetraciclina de la β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una formación catalizada por glicosiltransferasa de GlcNAc biseccionante, tienen mayor actividad ADCC (Umana *et al.*, *Mature Biotech.*, 17:176-180 (1999)).

La glicosilación de anticuerpos se realiza generalmente de modo N-enlazado u O-enlazado. N-enlazado se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un resto asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación O-enlazada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a

un hidroxiaminoácido, de forma más habitual serina o treonina, aunque también pueden utilizarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Los variantes de glicosilación de anticuerpos son variantes en los que el patrón de glicosilación de un anticuerpo está alterado. Alterar significa delecionar uno o más restos carbohidrato que se encuentran en el anticuerpo, añadir uno o más restos carbohidrato al anticuerpo, cambiar la composición de glicosilación (patrón de glicosilación), el grado de glicosilación, etc.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza de modo conveniente alterando la secuencia de aminoácidos, de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para los sitios de glicosilación N-enlazados). La alteración también puede realizarse mediante la adición o la sustitución de uno o más restos serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glicosilación O-enlazados). De modo similar, puede lograrse la eliminación de sitios de glicosilación mediante la alteración de aminoácidos dentro de los sitios de glicosilación nativos del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos habitualmente se altera mediante la alteración de la secuencia del ácido nucleico subyacente. Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-ErbB2 se preparan mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan al aislamiento desde una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales), o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagénesis de PCR, y mutagénesis de módulos de un variante preparado antes o de una versión no variante del anticuerpo anti-ErbB2.

La glicosilación (incluyendo el patrón de glicosilación) de los anticuerpos también puede alterarse sin alterar la secuencia de aminoácidos de la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran medida de la célula hospedante utilizada para expresar el anticuerpo. Puesto que el tipo celular utilizado para la expresión de las glicoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, como producto terapéutico potencial raramente es la célula nativa, pueden esperarse variaciones significativas en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Hse *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:9062-9070 (1997)). Además de la elección de las células hospedantes, los factores que afectan a la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, la formulación del medio, la densidad del cultivo, la oxigenación, el pH, los programas de purificación y similares. Se han propuesto diversos métodos para alterar el patrón de glicosilación en un organismo hospedante concreto que incluyen introducir o sobreexpresar ciertas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (patentes de EEUU n.ºs 5.047.335; 5.510.261; y 5.278.299). La glicosilación, o ciertos tipos de glicosilación, puede ser eliminada de modo enzimático de la glicoproteína, por ejemplo, utilizando endoglicosidasa H (Endo H). Además, la célula hospedante recombinante puede ser genéticamente modificada, por ejemplo, hacer que sea defectuosa para procesar ciertos tipos de polisacáridos. Estas técnicas y otras similares son muy conocidas en la técnica.

La estructura de glicosilación de los anticuerpos puede analizarse con facilidad mediante técnicas convencionales de análisis de carbohidratos, que incluyen cromatografía de lectina, RNM, espectrometría de masas, HPLC, GPC, análisis de la composición de monosacáridos, digestión enzimática secuencial, y HPAEC-PAD, que emplea una cromatografía de intercambio aniónico de pH alto para separar los oligosacáridos basándose en la carga. Los métodos para liberar los oligosacáridos para fines analíticos también son conocidos e incluyen, sin limitación, un tratamiento enzimático (realizado habitualmente utilizando péptido N-glicosidasa F/endo- β -galactosidasa), la eliminación utilizando un entorno alcalino duro para liberar principalmente estructuras O-enlazadas, y métodos químicos que emplean hidrazina anhidra para liberar oligosacáridos N- y O-enlazados.

(viii) Selección de anticuerpos con las propiedades deseadas

Anteriormente se han descrito técnicas para generar anticuerpos. También se pueden seleccionar anticuerpos con ciertas características biológicas, según se desee.

Por ejemplo, para identificar anticuerpos anti-ErbB2 inhibidores del crecimiento se pueden seleccionar anticuerpos que inhiban el crecimiento de las células cancerosas que sobreexpresan ErbB2. En un caso, el anticuerpo inhibidor del crecimiento elegido es capaz de inhibir el crecimiento de células SK-BR-3 en un cultivo celular en aproximadamente 20-100% y preferiblemente en aproximadamente 50-100% a una concentración de anticuerpos de aproximadamente 0,5 a 30 g/ml. Para identificar estos anticuerpos, puede realizarse el ensayo SK-BR-3 descrito en la patente de EEUU n.º 5.677.171. Según este ensayo, se cultivan células SK-BR-3 en una mezcla 1:1 de medio F12 y DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina y penicilina-estreptomicina. Las células SK-BR-3 se cultivan a 20.000 células en una placa de cultivo celular de 35 mm (2 ml/placa de 35 mm). Se añaden de 0,5 a 3 g/ml del anticuerpo anti-ErbB2 por placa. Después de seis días, se cuenta el número de células, comparadas con las células no tratadas, utilizando un contador de células COULTER electrónico. Los anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SK-BR-3 en aproximadamente 20-100% o en aproximadamente 50-100% pueden seleccionarse como anticuerpos inhibidores del crecimiento.

Para seleccionar los anticuerpos que inducen la muerte celular, puede evaluarse la pérdida de la integridad de la

membrana, según indica, por ejemplo, la captación de PI, azul de tripano o 7AAD, con relación a un control. El ensayo preferido es el ensayo de captación de PI empleando células BT474. Según este ensayo, se cultivan células BT474 (que pueden obtenerse en the American Type Culture Collection (Rockville, MD)) en medio de Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM):F-12 de Ham (50:50) suplementado con FBS termoinactivado al 10% (Hyclone) y L-glutamina 2 mM (así, el ensayo se realiza en ausencia de complemento y células efectoras inmunológicas). Las células BT474 se siembran a una densidad de 3×10^6 por placa en placas de 100 x 20 mm y se deja que se fijen durante la noche. El medio después se retira y se reemplaza por medio fresco solo o con medio que contiene 10 g/ml del anticuerpo monoclonal apropiado. Las células se incuban durante un periodo de 3 días. Después de cada tratamiento, las monocapas se lavan con PBS y se desprenden mediante tripsinización. Las células después se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C, el sedimento se resuspende en 3 ml de tampón de unión de Ca^{2+} enfriado en hielo (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl_2 2,5 mM) y se divide en partes alícuotas en tubos 12 x 75 de 35 mm tapados con un filtro (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de los agregados celulares. Los tubos después reciben PI (10 g/ml). Las muestras pueden analizarse utilizando un citómetro de flujo FACSCAN y el programa informático FACSCONVERT CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular, según se determina mediante la captación de PI, pueden seleccionarse como anticuerpos inductores de la muerte celular.

Para seleccionar los anticuerpos que inducen la apoptosis, está disponible un ensayo de unión de anexina que emplea células BT474. Las células BT474 se cultivan y se siembran en placas según se analizó en el párrafo anterior. El medio después se retira y se reemplaza por medio fresco solo o con medio que contiene 10 g/ml del anticuerpo monoclonal. Después de un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se desprenden mediante tripsinización. Las células después se centrifugan, se resuspenden en tampón de unión de Ca^{2+} y se dividen en partes alícuotas en tubos, según se indicó anteriormente para el ensayo de la muerte celular. Los tubos después reciben anexina marcada (por ejemplo, anexina V-FITC) (1 g/ml). Las muestras pueden analizarse utilizando un citómetro de flujo FACSCAN y el programa informático FACSCONVERT CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina, con relación a un control, se seleccionan como anticuerpos inductores de la apoptosis.

Además del ensayo de unión de anexina, está disponible un ensayo de tinción de ADN que emplea células BT474. Para realizar este ensayo, células BT474 que han sido tratadas con el anticuerpo de interés, según se describe en los dos párrafos anteriores, se incuban con HOECHST 33342 9 g/ml durante 2 h a 37 °C, y después se analizan en un citómetro de flujo EPICS ELITE (Coulter Corporation) utilizando el programa informático MODFIT LT (Verity Software House). Los anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas que es mayor en 2 veces (y preferiblemente mayor en 3 veces o más) que en las células no tratadas (hasta 100% de células apoptóticas) pueden seleccionarse como anticuerpos proapoptóticos utilizando este ensayo.

Para identificar un anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor ErbB, puede determinarse la capacidad del anticuerpo para bloquear la unión del ligando de ErbB a las células que expresan el receptor ErbB (por ejemplo, en conjugación con otro receptor ErbB con el cual el receptor ErbB de interés forma un heterooligómero de ErbB). Por ejemplo, las células que expresan de modo natural, o que se han transfectado para que expresen receptores ErbB del heterooligómero de ErbB pueden incubarse con el anticuerpo y después exponerse al ligando de ErbB marcado. Entonces puede evaluarse la capacidad del anticuerpo anti-ErbB2 para bloquear la unión del ligando al receptor ErbB en el heterooligómero de ErbB.

Por ejemplo, la inhibición de la unión de HRG a líneas de células de tumor de mama MCF7 por anticuerpos anti-ErbB2 puede realizarse utilizando cultivos en monocapa de MCF7 sobre hielo en un formato de placa de 24 pocillos fundamentalmente como se describe en el siguiente ejemplo 1. Pueden añadirse anticuerpos monoclonales anti-ErbB2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos. Entonces puede añadirse rHRG $1_{177-224}$ marcado con ^{125}I (25 pm), y la incubación puede continuar durante 4 a 16 horas. Pueden prepararse curvas de dosis-respuesta y puede calcularse un valor de CI_{50} para el anticuerpo de interés. En un caso, el anticuerpo que bloquea la activación por ligando de un receptor ErbB tendrá una CI_{50} para la inhibición de la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menor, más preferiblemente 10 nM o menor. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab, la CI_{50} para la inhibición de la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menor, más preferiblemente de 50 nM o menor.

Como alternativa, o además, puede evaluarse la capacidad de un anticuerpo anti-ErbB2 para bloquear la fosforilación de tirosina estimulada por el ligando de ErbB de un receptor ErbB presente en un heterooligómero de ErbB. Por ejemplo, pueden cultivarse células que expresan de modo endógeno los receptores ErbB, o transfectadas para que los expresen, con el anticuerpo y después ensayarse para la actividad de fosforilación de tirosina dependiente del ligando de ErbB utilizando un anticuerpo monoclonal antifosfotirosina (que está opcionalmente conjugado con un marcador detectable). El ensayo de activación del receptor de quinasa descrito en la patente de EEUU n.º 5.766.863 está disponible para determinar la activación del receptor ErbB y el bloqueo de esta actividad por un anticuerpo.

En un caso, se puede seleccionar un anticuerpo que inhiba la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina de p180 en células MCF7. Por ejemplo, las células MCF7 pueden cultivarse en placas de 24 pocillos y pueden añadirse anticuerpos monoclonales contra ErbB2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos a temperatura

ambiente; después puede añadirse rHRG $1_{177-224}$ a cada pocillo hasta 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 l de tampón de muestra de SDS (SDS al 5%, DTT 25 mM, y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25 l) puede someterse a una electroforesis sobre un gradiente de gel del 4-12% (Novex) y después transferirse electroforéticamente a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno). Pueden revelarse las inmunotransferencias de antifosfotirosina (a 1 g/ml), y puede cuantificarse la intensidad de la banda reactiva predominantemente a M_r aproximadamente 180.000 mediante densitometría de reflectancia. El anticuerpo seleccionado preferiblemente inhibe significativamente la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina de p180 en aproximadamente 0-35% del control en este ensayo. Puede prepararse una curva de dosis-respuesta para la inhibición de la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina de p180, según se determina mediante densitometría de reflectancia, y puede calcularse una CI_{50} para el anticuerpo de interés. En un caso, el anticuerpo que bloquea la activación por ligando de un receptor ErbB tendrá una CI_{50} para la inhibición de la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina de p180 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menor, más preferiblemente de 10 nM o menor. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab, la CI_{50} para la inhibición de la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina de p180 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menor, más preferiblemente de 50 nM o menor.

También se pueden evaluar los efectos inhibidores del crecimiento del anticuerpo sobre células MDA-MB-175, por ejemplo, fundamentalmente como se describe en Schaefer *et al.*, *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997). Según este ensayo, pueden tratarse células MDA-MB-175 con un anticuerpo monoclonal anti-ErbB2 (10 g/ml) durante 4 días y teñirse con violeta cristal. Una incubación con un anticuerpo anti-ErbB2 puede mostrar un efecto inhibidor del crecimiento sobre esta línea celular similar al mostrado por el anticuerpo monoclonal 2C4. En otro caso, HRG exógeno no revierte significativamente esta inhibición. Preferiblemente, el anticuerpo será capaz de inhibir la proliferación celular de las células MDA-MB-175 en un grado mayor que el anticuerpo monoclonal 4D5 (y opcionalmente en un grado mayor que el anticuerpo monoclonal 7F3), tanto en presencia como en ausencia de HRG exógeno.

En un caso, el anticuerpo anti-ErbB2 de interés puede bloquear la asociación dependiente de herregulina de ErbB2 con ErbB3 en células MCF7 y SK-BR-3, según se determina en un experimento de coimmunoprecipitación de una manera sustancialmente más eficaz que el anticuerpo monoclonal 4D5, y preferiblemente de una manera sustancialmente más eficaz que el anticuerpo monoclonal 7F3.

Para seleccionar los anticuerpos que se unen a un epitopo sobre ErbB2 al que se une un anticuerpo de interés, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado habitual, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, ed. Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, o además, puede realizarse un cartografiado de epitopos mediante métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las figuras 1A y 1B en la presente memoria).

A los resultados obtenidos en los ensayos basados en células descritos anteriormente puede seguir el ensayo en animales, por ejemplo, modelos murinos y ensayos clínicos humanos. En particular, puede demostrarse la incapacidad o la capacidad limitada de un anticuerpo para tratar tumores que sobreexpresan ErbB2 en el modelo de ratón transgénico descrito en la presente solicitud, según se describe en los siguientes ejemplos.

C. Conjugados de anticuerpo anti-ErbB-maitansinoide (inmunoconjugados)

Se preparan conjugados de anticuerpo anti-ErbB-maitansinoide mediante el enlace químico de un anticuerpo anti-ErbB con una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo ni de la molécula de maitansinoide. Los maitansinoides son muy conocidos en la técnica y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse a partir de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la patente de EEUU n.º 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones que no son patentes indicadas anteriormente en la presente memoria. Los maitansinoides preferidos son el maitansinol y los análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos conectores conocidos en la técnica para fabricar los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que incluyen, por ejemplo, los descritos en la patente de EEUU n.º 5.208.020 o en la patente EP 0 425 235 B1, y en Chari *et al.*, *Cancer Research*, 52: 127-131 (1992). Los grupos conectores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles frente a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles frente a peptidasas, o grupos lábiles frente a esterasas, según se describe en las patentes mencionadas anteriormente, siendo preferidos los grupos disulfuro y tioéter.

Los conjugados de anticuerpo y maitansinoide pueden prepararse utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio

(tales como bis(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, *Biochem. J.*, 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

- 5 El conector puede estar unido a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiente del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, en la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y en la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo, utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o de un análogo de maitansinol.

10 D. Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones terapéuticas de los conjugados de anticuerpo-maitansinoide utilizados según la presente invención para su conservación, mezclando un anticuerpo que tenga el grado deseado de pureza con vehículos, diluyentes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edición, Osol, A., ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son 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 benzetonio; fenol, butil o bencil alcohol; alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menores que aproximadamente 10 restos); 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 carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN, PLURONICS o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones de anticuerpos anti-ErbB2 liofilizadas preferidas se describen en el documento WO 97/04801.

Las formulaciones de la presente memoria también pueden contener más de un compuesto activo, según sea necesario para la indicación concreta que se esté tratando, preferiblemente los que tienen actividad complementarias que no afecten de modo adverso a los demás. Por ejemplo, puede resultar deseable proporcionar también anticuerpos o conjugados de anticuerpo-maitansinoide que se unen a EGFR, ErbB2 (por ejemplo, un anticuerpo que se une a un epitopo diferente sobre ErbB2), ErbB3, ErbB4, o el factor endotelial vascular (VEGF) en una sola formulación. Como alternativa, o además, la composición también puede comprender un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal y/o un cardioprotector. Estas moléculas están presentes, de modo adecuado, en combinación en unas cantidades que son eficaces para los objetivos previstos.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante 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. Estas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a edición, Osol, A., ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando estas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico), polilactidas (patente de EEUU n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno-acetato de etilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradable, tales como LUPRON DEPOT (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico).

50 Las formulaciones que se van a utilizar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto puede lograrse con facilidad mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

E. Tratamiento con los conjugados de anticuerpo anti-ErbB2-maitansinoide

Se contempla que los conjugados de anticuerpo anti-ErbB2-maitansinoide puedan utilizarse para tratar diversas enfermedades o trastornos. Los ejemplos de afecciones o trastornos incluyen tumores benignos o malignos; leucemias y malignidades linfoides; otros trastornos, tales como trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos, glandulares, de macrófagos, epiteliales, estromáticos, blastocéclicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

En general, la enfermedad o el trastorno que se a tratar es el cáncer. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o malignidades linfoides. Los ejemplos más concretos de estos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón microcítico, 5 cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer renal o de riñón, cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, 10 carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

El cáncer comprenderá células que expresan ErbB, de forma que un anticuerpo anti-ErbB de la presente memoria sea capaz de unirse al cáncer, y generalmente se caracterizará por la sobreexpresión del receptor ErbB. El cáncer comprende células que expresan ErbB2, aún más preferiblemente células que se caracterizan por la sobreexpresión del receptor ErbB2. Para determinar la expresión de ErbB, por ejemplo, ErbB2, en el cáncer, están disponibles 15 diversos ensayos de diagnóstico/prognóstico. La sobreexpresión de ErbB2 puede analizarse mediante IHC, por ejemplo, utilizando HERCEPTEST® (Dako). Secciones de tejidos sumergidas en parafina procedentes de la biopsia de un tumor pueden someterse al ensayo IHC y determinarse los criterios de intensidad de tinción de la proteína de ErbB2 como sigue:

- Puntuación 0: no se observa tinción o se observa tinción de las membranas en menos del 10% de las células tumorales. 20

- Puntuación 1+: se detecta una tinción de las membranas tenue/apenas perceptible en más del 10% de las células tumorales; las células solo se tiñen en parte de sus membranas.

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

- Puntuación 3+: se observa una tinción completa de las membranas de moderada a fuerte en más del 10% de las células tumorales. 25

Los tumores con una puntuación de 0 o 1+ para la evaluación de la sobreexpresión de ErbB2 pueden caracterizarse como que no sobreexpresan ErbB2, mientras que los tumores con una puntuación de 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que sobreexpresan ErbB2.

Como alternativa, o además, pueden realizarse ensayos FISH, tales como INFORM (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION (Vysis, Illinois) sobre tejido tumoral sumergido en parafina fijado con formaldehído, para determinar el grado (si existe) de sobreexpresión de ErbB2 en el tumor. 30

En un caso, el cáncer será un cáncer que expresa (y puede sobreexpresar) EGFR. Los ejemplos de cánceres que pueden expresar/sobreexpresar EGFR incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, 35 cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer renal o de riñón, 40 cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Preferiblemente, los inmunoconjugados de la presente invención y/o ErbB, por ejemplo, la proteína de ErbB2 o EGFR a la cual se unen, son internalizados por la célula, dando como resultado una mayor eficacia terapéutica de los inmunoconjugados para matar a la célula cancerosa a la cual se unen. En una realización preferida, el agente citotóxico (maitansinoide) se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. 45

El tratamiento de la presente descripción se dirige a tumores que sobreexpresan ErbB que no responden, o que responden muy mal, a un tratamiento con un anticuerpo anti-ErbB no conjugado. Estos pacientes pueden haber recibido un tratamiento previo con un anticuerpo anti-ErbB no conjugado con un resto maitansinoide, en el que el tratamiento previo puede no haber no producido una mejora significativa, o haya producido una respuesta transitoria. Sin embargo, el tratamiento previo de cualquier paciente concreto con un anticuerpo anti-ErbB no conjugado no es 50 un prerequisite para identificar pacientes que sean candidatos para un tratamiento según la presente descripción. Cualquier médico puede identificar con facilidad pacientes que se espera que se beneficien de un tratamiento con los inmunoconjugados de la presente invención basándose en datos clínicos disponibles al público o su propia experiencia. El tratamiento de mamíferos, y en particular de pacientes humanos, con o sin un tratamiento previo con un anticuerpo anti-ErbB (no conjugado) se encuentra específicamente dentro del alcance de la presente descripción. 55

Los conjugados de anticuerpo anti-ErbB-maitansinoide se administran a un mamífero, preferiblemente a un paciente humano, según métodos conocidos, tales como la administración intravenosa, por ejemplo, como una inyección en

embolada o mediante infusión continua, a lo largo de un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo.

- 5 Pueden combinarse otros regímenes terapéuticos con la administración de los conjugados de anticuerpo anti-ErbB-maitansinoide. La administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferiblemente existe un periodo de tiempo en el ambos agentes activos (o todos) ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

- 10 En un caso, el paciente se trata con dos o más anticuerpos anti-ErbB diferentes, de los cuales al menos uno está en forma de un conjugado de maitansinoide. Por ejemplo, el paciente puede tratarse con un primer conjugado de anticuerpo anti-ErbB2-maitansinoide, en el que el anticuerpo es un inhibidor del crecimiento (por ejemplo, HERCEPTIN®), y un segundo inmunocnjugado de anticuerpo o anticuerpo anti-ErbB2, por ejemplo, un conjugado de anticuerpo-maitansinoide que bloquee la activación por ligando de un receptor ErbB (por ejemplo, 2C4 o un variante de este humanizado y/o madurado por afinidad) o induzca la apoptosis de una célula que sobreexpresa ErbB2 (por ejemplo, 7C2, 7F3, o sus variantes humanizados). En otro caso, el tratamiento implica la administración de anticuerpos que se unen específicamente a dos o más receptores ErbB diferentes tales como, por ejemplo, receptores ErbB2 y EGFR, en el que al menos uno de los anticuerpos anti-ErbB se administra como un conjugado de maitansinoide. Preferiblemente, esta terapia combinada da como resultado un efecto terapéutico sinérgico.

- 15 Puede resultar deseable combinar la administración de los conjugados de anticuerpo anti-ErbB-maitansinoide con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno asociado a un tumor, que no sea un miembro de la familia de receptores ErbB. El otro anticuerpo, en este caso, puede unirse, por ejemplo, al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y puede estar en forma de un conjugado de maitansinoide u otro inmunocnjugado.

- 20 En un caso, el tratamiento de la presente descripción implica la administración combinada de un conjugado (o conjugados) de anticuerpo anti-ErbB2-maitansinoide y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, que incluye la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos preferidos incluyen taxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. La preparación y los programas de dosificación para estos agentes quimioterapéuticos pueden utilizarse según las instrucciones del fabricante, o según determinan de modo empírico los médicos expertos en la técnica. La preparación y los programas de dosificación para esta quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

- 25 Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide pueden combinarse con un compuesto antihormonal, por ejemplo, un compuesto antiestrógeno, tal como tamoxifeno; un compuesto antiprogesterona, tal como onapristona (véase el documento EP 616 812); o un compuesto antiandrógeno, tal como flutamida, en dosificaciones conocidas para estas moléculas. Cuando el cáncer que se va a tratar es un cáncer independiente de hormonas, el paciente puede haber sido sometido previamente a una terapia antihormonal, y después de que el cáncer se haya hecho independiente de hormonas, puede administrarse al paciente el anticuerpo anti-ErbB2 (y opcionalmente otros agentes, según se describe en la presente memoria).

- 30 A veces, puede resultar beneficioso coadministrar también un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada con la terapia) o una o más citoquinas al paciente. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a la eliminación quirúrgica de las células cancerosas y/o a una terapia de radiación.

35 Las dosificaciones adecuadas para cualquiera de los anteriores agentes coadministrados son las que se emplean en la presente memoria y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el anticuerpo anti-ErbB2.

- 40 Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de los conjugados de anticuerpo-maitansinoide dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, tal como se definió anteriormente, la gravedad y el desarrollo de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica y la respuesta al anticuerpo del paciente, y el criterio del médico encargado. El conjugado de anticuerpo-maitansinoide se administra de modo adecuado al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 g/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de conjugado de anticuerpo-maitansinoide será una dosificación inicial candidata para la administración al paciente, por ejemplo, en una o más administraciones separadas, o mediante una infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 g/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo del trastorno, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un régimen de dosificación preferido comprende la administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del conjugado de anticuerpo anti-ErbB2-maitansinoide. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El avance de esta terapia puede controlarse con facilidad mediante técnicas y ensayos convencionales.

F. Artículos manufacturados

En otro caso, se proporciona un artículo manufacturado que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo manufacturado comprende un recipiente y una etiqueta o un inserto en el envase sobre el recipiente o asociado a él. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados por una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar el trastorno y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa para una disolución intravenosa o un vial que tenga un tapón que pueda ser atravesado por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un conjugado de anticuerpo anti-ErbB2-maitansinoide. La etiqueta o el inserto en el envase indica que la composición se utiliza para tratar el trastorno elegido, tal como cáncer. En un caso, la etiqueta o el inserto en el envase indica que la composición que comprende el anticuerpo que se une a ErbB2 puede utilizarse para tratar un cáncer que exprese un receptor ErbB seleccionado del grupo que consiste en el receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR), ErbB2, ErbB3 y ErbB4, preferiblemente EGFR. Además, la etiqueta o el inserto en el envase puede indicar que el paciente que se va a tratar es un paciente que tiene un cáncer que se caracteriza por una activación excesiva de un receptor ErbB seleccionado de EGFR, ErbB2, ErbB3 o ErbB4. Por ejemplo, el cáncer puede ser un cáncer que sobreexpresa uno de estos receptores y/o que sobreexpresa un ligando de ErbB (tal como TGF- β). La etiqueta o el inserto en el envase también puede indicar que la composición puede utilizarse para tratar un cáncer, en el que el cáncer no se caracteriza por la sobreexpresión del receptor ErbB2. Por ejemplo, aunque el presente inserto en el envase para HERCEPTIN® indica que el anticuerpo se utiliza para tratar pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína de ErbB2, el presente inserto en el envase puede indicar que el anticuerpo o la composición se utiliza para tratar un cáncer que no responde, o responde muy mal, a un tratamiento con HERCEPTIN®. En otros casos, el inserto en el envase puede indicar que el conjugado de anticuerpo-maitansinoide o la composición puede utilizarse también para tratar un cáncer independiente de hormonas, cáncer de próstata, cáncer de colon o cáncer colorrectal. Además, el artículo manufacturado puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida de él, en el que la composición comprende un conjugado de maitansinoide de un primer anticuerpo que se une a ErbB2 e inhibe el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan ErbB2; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en él, en el que la composición comprende un segundo anticuerpo que se une a ErbB2 y bloquea la activación por ligando de un receptor ErbB, o un conjugado de este segundo anticuerpo con un maitansinoide. El artículo manufacturado también puede comprender un inserto en el envase que indique que la primera y la segunda composición pueden utilizarse para tratar un cáncer. Como alternativa, o además, el artículo manufacturado puede comprender también un segundo (o un tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWI), disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Otros detalles de la invención se ilustran en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Producción, caracterización y humanización del anticuerpo monoclonal anti-ErbB2 4D5

Se produjo el anticuerpo monoclonal murino 4D5 que se une específicamente al dominio extracelular de ErbB2 según se describe en Fendly *et al.*, *Cancer Research*, 50:1550-1558 (1990). Brevemente, células NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ (que expresan aproximadamente 1×10^5 moléculas de ErbB2/célula) producidas según se describe en Hudziak *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84:7158-7163 (1987) se recolectaron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene EDTA 25 mM y se utilizaron para inmunizar ratones BALB/c. Los ratones recibieron inyecciones i.p. de 10^7 células en 0,5 ml de PBS en las semanas 0, 2, 5 y 7. Los ratones con antisuero que inmunoprecipitó ErbB2 marcado con ^{32}P recibieron inyecciones i.p. de un extracto de membranas de ErbB2 purificado con aglutinina de trigo (WGA)-Sephacrose en las semanas 9 y 13. A esto le siguió una inyección i.v. de 0,1 ml de la preparación de ErbB2, y los esplenocitos se fusionaron con la línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653. Los sobrenadantes de los hibridomas se seleccionaron para la unión a ErbB2 mediante ELISA y radioinmunoprecipitación.

Cartografiado y caracterización de epitopos

Se determinó el epitopo de ErbB2 unido por el anticuerpo monoclonal 4D5 mediante un análisis de unión competitiva (Fendly *et al.*, *Cancer Research*, 50:1550-1558 (1990)). Se realizaron estudios de bloqueo cruzado por fluorescencia directa sobre células intactas utilizando la máquina de selección PANDEX™ Screen Machine para cuantificar la fluorescencia. El anticuerpo monoclonal se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (FITC), utilizando procedimientos establecidos (Wofsy *et al.*, *Selected Methods in Cellular Immunology*, p. 287, Mishel y Schiigi (eds.), San Francisco, W.J. Freeman Co. (1980)). Las monocapas confluentes de células NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ se tripsinizaron, se lavaron una vez y se resuspendieron a $1,75 \times 10^6$ células/ml en PBS frío que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5% y NaN_3 al 0,1%. Se añadió una concentración final de partículas de látex al 1% (IDC, Portland, OR) para reducir la coagulación de las membranas de la placa PANDEX™. Se añadieron 20 l de células en suspensión y 20 l de anticuerpos monoclonales purificados (de 100 g/ml a 0,1 g/ml) a los pocillos de la placa PANDEX™ y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se añadió una dilución predeterminada del anticuerpo

monoclonal marcado con FITC en 20 l a cada pocillo, se incubó durante 30 minutos, se lavó y se cuantificó la fluorescencia mediante PANDEX™. Se consideró que los anticuerpos monoclonales compartían un epitopo si cada uno bloquea la unión del otro en 50% o mayor, en comparación con un anticuerpo monoclonal control irrelevante. En este experimento, se asignó el epitopo I al anticuerpo monoclonal 4D5 (restos aminoácidos desde aproximadamente 529 a aproximadamente 625, ambos inclusive, dentro del dominio extracelular de ErbB2 (véase SEQ ID NO:3)).

Se evaluaron las características inhibitorias del crecimiento del anticuerpo monoclonal 4D5 utilizando la línea de células de tumor de mama SK-BR-3 (véase Hudziak *et al.*, *Molec. Cell. Biol.*, 9(3):1165-1172 (1989)). Brevemente, se desprendieron células SK-BR-3 utilizando tripsina al 0,25% (en vol/vol) y se suspendieron en medio completo a una densidad de 4×10^5 células por ml. Se cultivaron partes alícuotas de 100 l (4×10^4 células) en placas de microdilución de 96 pocillos, se dejó que las células se adhirieran y después se añadieron 100 l de medio solo o de medio que contiene el anticuerpo monoclonal (concentración final 5 g/ml). Después de 72 horas, las placas se lavaron dos veces con PBS (pH 7,5), se tiñeron con violeta cristal (al 0,5% en metanol) y se analizaron para la proliferación celular relativa según se describe en Sugarman *et al.*, *Science*, 230:943-945 (1985). El anticuerpo monoclonal 4D5 inhibe la proliferación celular relativa de SK-BR-3 en aproximadamente 56%.

El anticuerpo monoclonal 4D5 también se evaluó para su capacidad para inhibir la fosforilación de tirosina estimulada por HRG de proteínas en el intervalo de M_r 180.000 procedentes de lisados de células completas de células MCF7 (Lewis *et al.*, *Cancer Research*, 56:1457-1465 (1996)). Se ha indicado que las células MCF7 expresan todos los receptores ErbB conocidos, pero a niveles relativamente bajos. Puesto que ErbB2, ErbB3 y ErbB4 tienen un tamaño molecular casi idéntico, no es posible discernir cuál es la proteína que está siendo fosforilada en la tirosina cuando se evalúan lisados de células completas mediante un análisis de transferencia Western. Sin embargo, estas células son ideales para los ensayos de fosforilación de tirosina por HRB porque, bajo las condiciones de ensayo utilizadas, en ausencia de HRG añadido de modo exógeno, muestran unos niveles de bajos a indetectables de proteínas de fosforilación de tirosina en el intervalo de M_r 180.000.

Las células MCF7 se cultivaron en placas de 24 pocillos y se añadieron anticuerpos monoclonales contra ErbB2 a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente; después se añadió rHRG 1₁₇₇₋₂₄₄ a cada pocillo hasta 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 l de tampón de muestra de SDS (SDS al 5%, DTT 25 mM, y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25 l) se sometió a una electroforesis sobre un gel con gradiente del 4-12% (Novex), y después se transfirió electroforéticamente a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno). Se revelaron las inmunotransferencias de antifosfotirosina (4G10, de UBI, utilizada a 1 g/ml) y se cuantificó la intensidad de la banda reactiva predominante a M_r 180.000 mediante densitometría de reflectancia, según se ha descrito previamente (Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205-1210 (1992); Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:14661-14665 (1994)).

El anticuerpo monoclonal 4D5 inhibe significativamente la generación de una señal de fosforilación de tirosina inducida por HRG a M_r 180.000. En ausencia de HRG es incapaz de estimular la fosforilación de la tirosina de proteínas en el intervalo de M_r 180.000. Además, este anticuerpo no presenta reacción cruzada con EGFR (Fendly *et al.*, *Cancer Research*, 50:1550-1558 (1990)), ErbB3 ni ErbB4. El anticuerpo monoclonal 4D5 es capaz de bloquear la estimulación de HRG de la fosforilación de tirosina en 50%.

Se evaluó el efecto inhibitor del crecimiento del anticuerpo monoclonal 4D5 sobre células MDA-MB-175 y SK-BR-3 en presencia o en ausencia de rHRG 1 exógeno (Schaefer *et al.*, *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997)). Los niveles de ErbB2 en células MDA-MB-175 son 4-6 veces mayores que el nivel que se encuentra en células epiteliales de mama normales, y el receptor ErbB2-ErbB4 está constitutivamente fosforilado en la tirosina en células MDA-MB-175. El anticuerpo monoclonal 4D5 fue capaz de inhibir la proliferación de células MDA-MB-175, en presencia y en ausencia de HRG exógeno. La inhibición de la proliferación celular por 4D5 depende del nivel de expresión de ErbB2 (Lewis *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 37:255-263 (1993)). Puede detectarse una inhibición máxima de 66% en células SK-BR-3. Sin embargo, este efecto puede ser superado por HRG exógeno.

Humanización

El anticuerpo monoclonal murino 4D5 se humanizó utilizando una nueva estrategia de "mutagénesis de conversión de genes", según se describe en la patente de EEUU n.º 5.821.337, cuya descripción completa se incorpora expresamente en la presente memoria como referencia. El anticuerpo monoclonal humanizado 4D5 utilizado en los siguientes experimentos se denomina huMAb4D5-8. Este anticuerpo tiene el isotipo IgG1.

Ejemplo 2: Conjugados de HERCEPTIN®-DM1

1. Purificación de HERCEPTIN®

Se disuelve HERCEPTIN® (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, patente de EEUU n.º 5.821.337) (1 vial que contiene 440 mg de anticuerpo) en 50 ml de tampón MES (MES 25 mM, NaCl 50 mM, pH 5,6). La muestra se carga sobre una columna de intercambio catiónico (Sephacrose S, 15 cm x 1,7 cm) que ha sido equilibrada en el mismo tampón. La columna también se lava con el mismo tampón (5 volúmenes de columna). Se eluye el HERCEPTIN® aumentando

la concentración de NaCl en el tampón hasta 200 mM. Las fracciones que contienen el anticuerpo se reúnen, se diluyen hasta 10 mg/ml y se dializan en un tampón que contiene fosfato de potasio 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5.

2. Modificación de HERCEPTIN® con SPP

- 5 El anticuerpo HERCEPTIN® purificado se modificó con N-succinimidil-4-(2-piridil)pentanoato (SPP) para introducir grupos ditiopiridilo. El anticuerpo (376,0 mg, 8 mg/ml) en 44,7 ml de tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5) que contiene NaCl (50 mM) y EDTA (1 mM) se trató con SPP (5,3 equivalentes molares en 2,3 ml de etanol). Después de una incubación durante 90 minutos bajo una atmósfera de argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró en gel a través de una columna de Sephadex G25 equilibrada con citrato de sodio 35 mM, NaCl 154 mM, EDTA 2 mM. Las fracciones que contienen anticuerpo se reúnen y se ensayan. Se determina el grado de modificación del anticuerpo según se describió anteriormente. La recuperación del anticuerpo modificado (HERCEPTIN®-SPP-Py) fue de 337 mg (89,7%) con 4,5 grupos 2-tiopiridina liberables unidos por anticuerpo.

3. Conjugación de HERCEPTIN®-SPP-Py con DM1

- 15 El anticuerpo modificado (337,0 mg, 9,5 µmol de grupos 2-tiopiridina liberables) se diluyó con el anterior tampón citrato de sodio 35 mM, pH 6,5, hasta una concentración final de 2,5 mg/ml. Entonces se añadió DM1 (cuya estructura se muestra en la figura 1) (1,7 equivalentes, 16,1 µmol) en dimetilacetamida 3,0 mM (DMA, al 3% en v/v en la mezcla de reacción final) a la disolución de anticuerpo. La reacción se desarrolla a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón durante 20 horas. La estructura de los conjugados de HERCEPTIN®-DM1 se ilustra en la figura 2.
- 20 La reacción se carga sobre una columna de filtración en gel de Sephacryl S300 (5,0 cm x 90,0 cm, 1,77 l) equilibrada con citrato de sodio 35 mM, NaCl 154 mM, pH 6,5. El caudal es de 5,0 ml/min y se recogen 65 fracciones (20,0 ml cada una). Un pico principal se centra alrededor de la fracción n.º 47 (figura 3). El pico principal comprende HERCEPTIN®-DM1 monomérico. Se reúnen las fracciones 44-51 y se ensayan. Se determina el número de moléculas del fármaco DM1 unidas por molécula de anticuerpo midiendo la absorbancia a 252 y 280 nm, y se descubre que es de 3,7 moléculas de fármaco por molécula de anticuerpo.

Ejemplo 3: Animales transgénicos

- Para mejorar la actividad clínica de HERCEPTIN®, se desarrolló un modelo de ratón HER2-transgénico con el que pueden ensayarse de modo preclínico nuevas terapias dirigidas a HER2. En los ratones transgénicos que expresan una forma mutacionalmente activada de *neu*, el homólogo de rata de HER2, se desarrollan tumores con facilidad, pero el HER2 que se sobreexpresa en cánceres de mama no está mutado, y la formación de tumores es mucho menos robusta en ratones transgénicos que sobreexpresan HER2 no mutado (Webster *et al.*, *Semin. Cancer Biol.*, 5: 69-76 (1994)). Para mejorar la formación de tumores con HER2 no mutado se empleó una estrategia para potenciar aún más la sobreexpresión de HER2 no mutado en un ratón transgénico.

- 35 Cualquier promotor que estimule la expresión de HER2 en células epiteliales en la glándula mamaria de ratón puede utilizarse en las construcciones descritas. Muchos de los genes de las proteínas de la leche son transcritos por elementos de promotor/potenciador que son específicamente activos en las glándulas mamarias. Los genes de las proteínas de la leche incluyen los genes que codifican caseínas (α -S, y β) β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y la proteína ácida del suero. El promotor de β -lactoglobulina ovino está bien caracterizado y se emplea mucho en la técnica (Whitelaw *et al.*, *Biochem J.*, 286:31-39 (1992)). Sin embargo, también son adecuados fragmentos similares de ADN de promotor de otras especies. Un promotor preferido es el promotor derivado de la repetición terminal larga (LTR) del virus de tumor mamario de ratón (MMTV). Se generó una construcción de transgén de HER2 empleando el promotor MMTV LTR.

- 45 Para mejorar la formación de tumores con HER2 no mutado se generaron ratones transgénicos utilizando un plásmido de ADNc de HER2 en el que un ATG cadena arriba se deleciona para evitar el inicio de la traducción en estos codones ATG cadena arriba, que de otra forma reduciría la frecuencia del inicio de la traducción desde el codón de inicio auténtico cadena abajo de HER2 (por ejemplo, véase Child *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274: 24335-24341 (1999)). Además, se añadió un intrón quimérico en el extremo 5', que también debería potenciar el nivel de expresión, tal como se ha indicado previamente (Neuberger y Williams, *Nucleic Acids Res.*, 16:6713 (1988); Buchman y Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 8:4395 (1988); Brinster *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:836 (1988)). El intrón quimérico se derivó de un vector de Promega, el vector de expresión de mamífero pCI-neo (pb 890-1022). El extremo 3' del ADNc está flanqueado por los exones 4 y 5 de la hormona del crecimiento humana y secuencias de poliadenilación. Además, se emplearon ratones FVB, porque esta raza es más susceptible al desarrollo de tumores. Se empleó el promotor de MMTV-LTR para asegurar la expresión de HER2 específica de tejido en la glándula mamaria. Los animales recibieron una dieta AIN 76A para aumentar la susceptibilidad a la formación de tumores (Rao *et al.*, *Breast Cancer Res. and Treatment*, 45:149-158 (1997)). La secuencia de nucleótidos de esta construcción de plásmido de transgén (SEQ ID NO:1) se muestra en la figura 4.

Los animales adecuados para los experimentos transgénicos pueden obtenerse de fuentes comerciales

convencionales, tales como Taconic (Germantown, N.Y.). Son adecuadas muchas razas, pero se prefieren los ratones hembra FVB por su mayor susceptibilidad a la formación de tumores. Los machos FVB se emplean para el apareamiento y se utilizando sementales CD.1 vasectomizados para estimular la pseudopreñez. Pueden obtenerse ratones vasectomizados de cualquier suministrador comercial. Los fundadores se cruzan con ratones FVB o con ratones heterocigóticos 129/BL6 x FVB p53. Los ratones con heterocigosis en el alelo p53 se emplean para aumentar potencialmente la formación de tumores. Sin embargo, esto ha demostrado ser innecesario. Por tanto, algunos tumores F1 son de la raza mixta. Los tumores de los fundadores son solo FVB. Se obtuvieron seis fundadores con algunos tumores en desarrollo que no han tenido camadas.

Ejemplo 4: El ratón HER2-transgénico como modelo tumoral para evaluar terapias dirigidas a HER2

Las biopsias de glándulas mamarias de un ratón transgénico fundador generado como se describe en el ejemplo 3 mostraron expresión 3+ de HER2, según se determina mediante tinción inmunohistoquímica, con aproximadamente 2 meses de edad. La cantidad de dominio extracelular de HER2 (ECD) desprendido hacia el suero se midió y se descubrió que era de aproximadamente 1,2 ng/ml (Huang *et al.*, *supra*). Este ratón posteriormente desarrolló un tumor mamario a los 5 meses de edad, después de parir 4 camadas. El tumor se reseccionó de modo quirúrgico bajo condiciones asépticas y se trituró en trozos pequeños, 2 mm³, que después se transplantaron a la almohadilla de grasa mamaria de ratones hembra FVB de tipo salvaje. Se desarrollaron tumores en 22 de los 31 ratones receptores, con una latencia de 5 semanas. Con la posterior transferencia, los tumores se desarrollaron con una latencia más corta y crecieron con más rapidez, y la incidencia de los tumores aumentó hasta >95% de los receptores. La expresión de HER2, según se determina mediante tinción inmunohistoquímica, fue de 3+ pero heterogénea en el tumor primario, que se convirtió en 3+ uniforme después de la primera transferencia.

El tratamiento de ratones que portan tumores con HERCEPTIN® o 4D5, el anticuerpo murino a partir del cual se deriva el HERCEPTIN® humanizado, solo produce un efecto modesto sobre el crecimiento de los tumores transplantados (figura 5). La expresión de HER2 fue de 3+ en tumores que crecieron durante la terapia con HERCEPTIN® o 4D5, lo cual indica que no existe selección de tumores HER2-negativos. Además, se detectó cy3-HERCEPTIN® decorando las células tumorales después de la inyección en ratones que portan tumores, lo cual indica que la falta de eficacia no fue debida a la incapacidad del anticuerpo para acceder al tumor.

Basándose en la expresión persistente de HER2 y la incapacidad de este modelo tumoral para responder a HERCEPTIN®, se ensayó una nueva estrategia, utilizando HERCEPTIN® conjugado con el maitansinoide DM1, según se describe en el ejemplo 3. La figura 5 demuestra que el conjugado de HERCEPTIN®-DM1 tiene una espectacular actividad antitumoral en este modelo. El RITUXAN®, un anticuerpo monoclonal anti-CD20 no relacionado, se empleó como control negativo para estos estudios. Se produjo poca respuesta frente a HERCEPTIN®, comparado con el anticuerpo control, RITUXAN®, pero se produjo una notable actividad antitumoral del conjugado de maitansinoide de HERCEPTIN®. Tal como se muestra en la figura 5, todos los ratones tratados con HERCEPTIN®-maitansinoide mostraron un notable encogimiento de sus tumores, aunque ninguno desapareció. Después de aproximadamente 4 semanas, los tumores volvieron a crecer. En este momento se sacrificaron cinco animales. Se descubrió que sus tumores expresaban HER2 a niveles 3+. Así, no se produjo selección por tumores HER2-negativos. Basándose en esta observación, los 3 ratones restantes se trataron con HERCEPTIN®-maitansinoide durante 5 días consecutivos. Los tumores de nuevo retrocedieron en respuesta al tratamiento.

Depósito del material biológico

Se han depositado las siguientes líneas celulares de hibridoma en the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EEUU (ATCC):

Denominación del anticuerpo	ATCC n.º	Fecha de depósito
7C2	ATCC HB-12215	17 de octubre, 1996
7F3	ATCC HB-12216	17 de octubre, 1996
4D5	ATCC CRL 10463	24 de mayo, 1990
2C4	ATCC HB-12697	8 de abril, 1999

Este depósito se realizó según las disposiciones de the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure y las regulaciones allí expuestas (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de cultivos viables durante 30 años desde la fecha del depósito. El ATCC puede suministrar los organismos bajo los términos del Tratado de Budapest, y sometido a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura una disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie de los cultivos al público tras la expedición de la pertinente patente de EEUU o tras abrir al público cualquiera de las solicitudes de patente de EEUU o de otro país, cualquiera que sea la primera, y asegura la disponibilidad de la

progenie para aquellos que the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks determine que tenga derecho a ello, según 35 USC §122 y las normas de dicho comisiario conformes a ello (que incluye 37 CFR §1.12 con particular referencia a 886 OG 638).

5 Con respecto a las denominaciones para las que se busca una patente europea, una muestra del microorganismo depositado estará disponible hasta la publicación de la mención de la concesión de la patente europea, o hasta la fecha en la que la aplicación haya sido rechazada o retirada o se considere retirada, solo mediante la entrega de dicha muestra a un experto nombrado por la persona que pide la muestra (Regla 28(4) EPC).

10 El cesionario de la presente solicitud ha accedido a que, si los cultivos en depósito mueren o se pierden o se destruyen cuando se cultivan bajo condiciones adecuadas, estos serán reemplazados inmediatamente tras la notificación por un espécimen viable del mismo cultivo. La disponibilidad de las cepas depositadas no debe considerarse una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos otorgados bajo la autoridad de ningún gobierno según sus leyes de patentes.

15 La anterior memoria descriptiva escrita se considera suficiente para que los expertos en la técnica practiquen la invención. La presente invención no se ve limitada en su alcance por las construcciones depositadas, puesto que se pretende que las realizaciones depositadas solo ilustren ciertos aspectos de la invención, y cualquier construcción que sea funcionalmente equivalente se encuentra dentro de la invención. El depósito de los materiales en la presente memoria no constituye una admisión de que la presente memoria descriptiva escrita sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo su mejor modo, ni debe considerarse limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representan. En efecto, a partir de la anterior descripción, serán evidentes para los expertos en la técnica diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente memoria, y se encontrarán dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

20 Se entiende que la aplicación de las indicaciones de la presente invención a un problema o situación específicos está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica a la luz de las indicaciones contenidas en la presente memoria. Los ejemplos de los productos de la presente invención y los procesos representativos para su aislamiento, uso y fabricación aparecen a continuación, pero no deben considerarse que limiten la invención.

25

REIVINDICACIONES

- 1.- Un conjugado de anticuerpo-maitansinoide, en el que el anticuerpo es huMAb4D5-8, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, para su uso para tratar un cáncer en un paciente humano, en el que el cáncer se caracteriza por la sobreexpresión del receptor ErbB2.
- 5 2.- El conjugado para su uso según la reivindicación 1, en el que el maitansinoide es maitansinol, un éster de maitansinol, o DM1.
- 3.- El conjugado para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que (i) el conjugado se coadministra con un agente quimioterapéutico en formulaciones separadas o en una única formulación farmacéutica; o (ii) el conjugado se administra consecutivamente con un agente quimioterapéutico, en el que la administración consecutiva se produce en cualquier orden.
- 10 4.- El conjugado para su uso según la reivindicación 3, en el que el agente quimioterapéutico es un taxano.
- 5.- Una formulación farmacéutica que comprende un conjugado de anticuerpo-maitansinoide, en la que el anticuerpo es huMAb4D5-8, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, para su uso para tratar un cáncer en un paciente humano, en el que el cáncer se caracteriza por la sobreexpresión del receptor ErbB2.
- 15 6.- La formulación para su uso según la reivindicación 5, en la que el maitansinoide es maitansinol, un éster de maitansinol, o DM1.
- 7.- El conjugado para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o la formación para su uso según la reivindicaciones 5 o la reivindicación 6, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de células escamosas, cáncer de células escamosas epitelial, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, y cáncer de cabeza y cuello.
- 20
- 25

Maitansinoides (DM1)

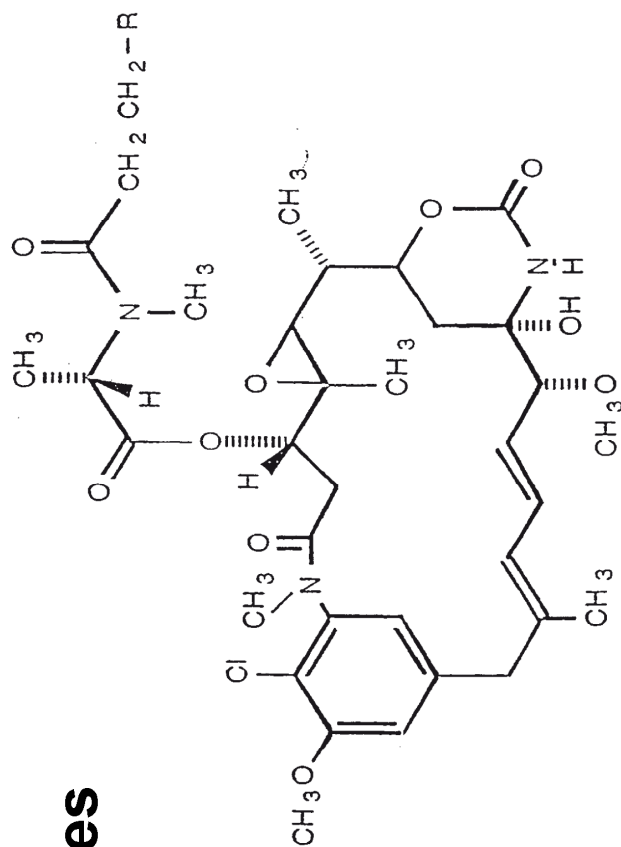


Figura 1

Figura 2

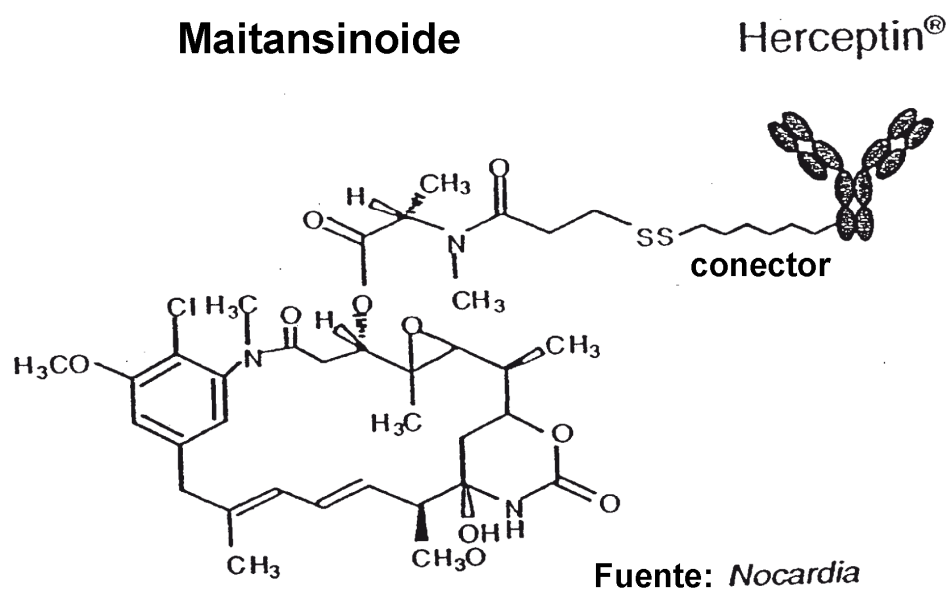


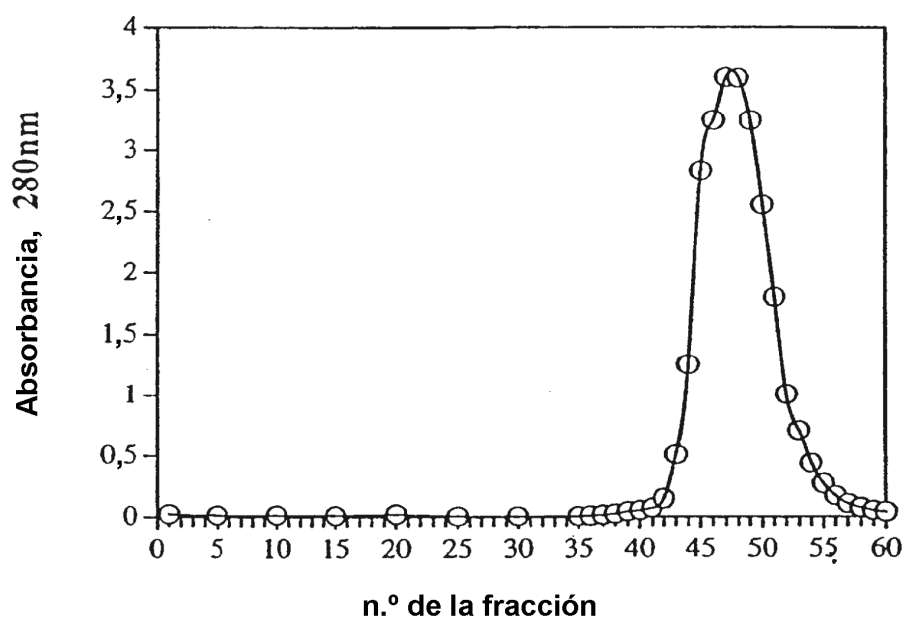
Fig. 3 Perfil de elución en S300 de Herceptin-DM1

Figura 4

```

1  AAGCTCGATC GGTGCACATT AATTCATGAT CGCGAGCTAG CAGCTTGCAT GCCTCCAGCA GAAATGGTTG AACTCCCGAG AGTGCTCTAC ACCTAGGGGA
TTCGAGCTAG CCACGTGTAA TTAAGTACTA GCGCTCGATC GTCCAGCTA CGGAGCTCGT CTTTACAAC TTGAGGGGTC TCACAGGATG TGGATCCCTC
^ inicio del conector 1 ^ fin del conector 1 ^ inicio del promotor MMTV

sau3AI hgiAI/asphI sau3AI maeI rmaI
mboI/ndeII mboI/ndeII dpnII nheI nlaIII tseI
dpnII bsp1286 dpnI cac8I tseI sphI fnu4HI/bsouI
pvuI/bspCI mseI nlaIII/thaI cac8I nspHI bsvI
mcrI bsiHKAI tsp509I fnuDII/mvnI cac8I scfI
bsiEI bmyI aseI/asnI/vspI bstUI bfaI aluI nspI pstI
taqI apaLI/snoI rcaI bsh1236I fnu4HI/bsouI cac8I
aluI dpnI alw44I/snoI bspHI nrui aluI bsvI cac8I bsgI
1 AAGCTCGATC GGTGCACATT AATTCATGAT CGCGAGCTAG CAGCTTGCAT GCCTCCAGCA GAAATGGTTG AACTCCCGAG AGTGCTCTAC ACCTAGGGGA
TTCGAGCTAG CCACGTGTAA TTAAGTACTA GCGCTCGATC GTCCAGCTA CGGAGCTCGT CTTTACAAC TTGAGGGGTC TCACAGGATG TGGATCCCTC
^ inicio del conector 1 ^ fin del conector 1 ^ inicio del promotor MMTV

styI hgiJII
bsaJI bsp1286
tseI hinPI hhaI/cfoI bmyI mwoI
fnu4HI/bsouI mstI avIII/fspI foki bstF5I
bbvI bsaJI ahdI/eam1105I styI bcgI avIII/fspI foki bstF5I
101 GAAGCAGCCA AGGGTTCTTT TCCACCAAG GAGGACCGT CTGGCCACAA ACGGATGAGC CCATCAGACA AAGACATATT CATTCTCTGC TGCAAACTTG
CTTCGTGGT TCCCAACAA AGGGTGGTTC CTGCTGGGCA GACGGGTGT TCCCTACTCG GGTAGTCTGT TTCTGTATTA GTAAGAGACG ACGTTTGAA
mwoI hgiJII mboII
cac8I hgiJII earI/ksp632I
hgiAI/asphI bsp1286 pleI tru9I sapI manI
bsiHKAI bmyI bmyI banII hphI hinfI mseI aluI bsaBI
mwoI acII bmyI TTCGTCTCG CAGGGCTCTC ACCCTTGACT CTTTAAATAG CTCCTCTCTG CAAGATTACA
aluI 201 GCATAGCTCT GCTTTGCTGG GGCATTGGGG GAAGTTGGGG TTCGTCTCG CAGGGCTCTC ACCCTTGACT CTTTAAATAG CTCCTCTCTG CAAGATTACA
CGTATCGAGA CGAAACGACC CCGTAACCCC CTTCAACGCC AAGCAGGAG GTCCCGAGAG TGGGAACCTGA GAAAATTATC GAGAAGACAC GTTCTAATGT

```

claiI/bsp105
bspDI
sfanI
acilI taqI
fnu4HI/bsoFI
eco57I

301 ATCTAAACAA TTGGGAGAAC TCGACCTTCC TCTCCTGAGG CAAGGACCAC AGCCCACTTC CTCITACAAG CGCATCGAT TTTGTCTCTC AGAATAGAA
TAGATTGTT AAGCCTCTTG AGCTGGAAGG AGAGGACTCC GTTCTCTGTTG TCGGTGAAG GAGAATGTC GCGTAGCTA AACAAGGAAG TCTTTATCTT

rsal
csp6I

cac8I
bsmI
tsp509I
tru9I msel
maeIII
mnlI mboII
tsp509I
munI/mfeI
mnlI mboII
hgaI
esp3I
bsmBI
bsmAI
tsp509I
apoi
tsp509I
bsmFI
scrFI
mvaI
ecoRII
dsav
bstNI
bssKI
bsaJI
apyI
bsmFI
bsmAI
cctAGAAGTA AAAAGGGA AAAAGAGTGT TTTTGTCAA ATAGAGACA GGTGTGTGCA ACCAGGACT TATAGGGGAC CTTACATCTA CAGACCAACA
GGATCTCAT TTTTTCCTT TTTTCTCACA AAAACAGTTT TATCTCTGT CCACCACGT TGTCTCTGTA ATATCCCTG GAATGATGAT GTCTGGTTGT

701 ATGATGCCCCC TACCATATAC AGGAAGATAT GACTTAAAT GGTACAGTC AATGCTATA AAGTGTATA TAGATCCCTC CTTTTCTGTT
CTACGGGGGA ATGATATATG TCCCTCTATA CTGAATTTAA CCCTATCCAC CCAATGTGAC TTACCGATAT TTCACAAAT ATCTAGGGAG GGAAGAGC

sfanI
bslI
mboII
tru9I msel
maeIII
tsp509I
bsmFI
scrFI
mnlI
sau3AI
mboI/ndelI
dpmI
dpmI
alwI
bstVI/xhoII

```

rmaI      styI      nlaIII      rmaI      nlaIII
maeI      bsaJI      rsaI      maeI
bfaI      mnlI      csp6I      bfaI      bsmI
alul      mnlI      mboII      bsmI      bsmI
pleI      hinFI      nlaIII      bsmI      bsmI
801 AAAGACTCGC CAGAGCTAGA CCTCCTTGGT GTATGTTGTC TCAAGAAGAA AAAGACGACA TGAACAACA GGTACATGAT TATATTTATC TAGGAACAGG
TTTCTGAGCG GTCTCGATCT GGAGGAACCA CATAACAACAG AGTTCTTCTT TTTCTGCTGT ACTTTGTTGT CCACTGTACTA ATATAAATAG ATCCTTGTC
      tspRI
      styI      alwNI
      bsaJI      bsmFI
      bsaJI      mnlI      alw26I/bsmAI      nlaIII
901 AATGCACTTT TGGGAAAGA TTTTCCATAC CAAGGAGGGG ACAGTGGCTG GACTAATAGA ACATTATTCT GCAAAACCTT ATGCGCATGAG TTATTATGAA
TTACGTGAAA ACCCCTTTCT AAAAGGTATG GTTCCTCCCC TGTCAACGAC CTGATTATCT TGTATAAGA CGTTTTTGAA TACCGTACTC AATAATACTT
      tru9I
      sau96I      styI      msel      foki
      haeIII/palI      nlaIV      smlI      tru9I      bstF5I
      asuI      aciI      bsaJI      aflII/bfrI      maeIII      msel      mnlI      bsmAI
1001 TAGCCTTTAT TGGCCCAACC TTGCGGTTCC CAAGGCTTAA GTAAGTTTGT GGTACAAAC TGTCTTAAA ACGAGGATGT GAGACAAAGT GTTCTCTGAC
ATCGGAAATA ACCGGTTGG AACGCCAAGG GTTCCGAATT CATTCAAAA CCAATGTTTG ACAAGAATTT TGCTCCTACA CTCTGTTTAC CAAAGGACTG
      sstI
      sacI
      hgiIII
      hgiAI/aspHI
      eclI36II
      bspI286
      bsiHKAII
      bmyI
      ddeI
      sau3AI
      mboI/ndeII
      dpnII alul
      dpnI banII ddeI
      tsp509I
      apoI
1101 TTGGTTTGGT ATCAAAGGTT CTGATCTGAG CTCTGAGTGT TCTATTTTCC TATGTTCTTT TGAATTTAT CCAATCTTA TGTAATGCT TATGTAACCC
AACCAAACCA TAGTTTCCAA GACTAGACTC GAGACTCACA AGATAAAGG ATACAAGAA ACCTTAATA GGTTTAGAAT ACATTTACGA ATACATTTGG

```

bsmAI
esp3I
fokI bsmBI bsrBI tsp4SI
bstF5I acII maeIII
1201 AAGATATAAA AGAGTGCTGA TTTTGTGAGT AAACCTGCAA CAGTCCTAAC ATTCACTCT TGTGTGTTTG TGTCTGTTCG CCATCCCGTC TCCGCTCGTC
TTCTATATTT TCTCAGACT AAAAACAATCA TTGAACGTT GTCAGGATTG TAAGTGAGA ACACACAAC ACAGACAAGC GGTAGGCAG AGGCAGCAG

mnII
hphI
sau3AI
alwI
sau96I
nlaIV
avaII
asuI
sanDI
ppuMI
nlaIV
eco109I/draII
mnII bsmFI acII
1301 ACTTATCCTT CACTTTCAG AGGTCCCC CCAGACCCC GGATCGCTAG CTCGCCAATC GATAAGCTTG CGGCCGCTTA ACTGCAGAAG TTGGTCGTGA
TGAATAGGAA GTGAAGGTC TCCAGGGGG GCGTCTGGG CCTAGGATC GAGCGCTAG CTATTGGAAC GCCGGCGAAT TCACGTCTTC AACACGACT

fnu4HI/bsrFI
haeIII/palI
mcrI
eagI/xmaIII/ecI XI
eaeI
notI
fnu4HI/bsrFI scfI
cfrI tru9I
pstI
bsgI
nmlI

bsrI
tspRI bspMI
ggcACTGGC AGTAAAGTAT CAAGTTTACA AGACAGGTTT AAGGAGACCA ATAGAAACTG GGCTGTTCGA GACAGAGAAG ACTCTTGGT TTCTGATAG
CCGTGACCCG TCCATTTCATA GTTCCAATGT TGTGTCCAAA TTCTCTGGT TAICTTTGAC CCGAACAGCT CTGTCTCTTC TGAGAACGCA AAGACTATCC

bsrI
nlaIV
hgiCI
banI

pleI
hinFI
mboII
bsmAI
bpuAI
bsrI
bsrI
tru9I bsmAI
mseI bsal
maeIII

bp820 en pCI
^ inicio del inserto del intrón BS en Cla
^ inicio del inserto de BS en HindIII

^ inicio del intrón quimérico en pCI 857

```

fnu4HI/bsoFI
mcrI
eagI/xmaIII/ecI XI
eaeI
cfrI
notI
fnu4HI/bsoFI
tru9I haeIII/palI tsp50
mseI bsiEI hindIII ecorI
alul smI acil acil alul tagI
apyl alul smI acil acil alul tagI
bslI bsaJI tsp509I aflII/bfrI cac8I ecorV apoI
TCAATTACA GCTCTTAAGC GGCCGCAAGC TTGATATCGA
GTGAGGGTCC AGTTAATCT CGAGAAATTCG CCGGGGTTCG AACTATAGCT
^ final del intrón quimérico en pCI 989

```

final del inserto de BS en HindIII ^

```

1501 CACCTATTGG TCTTACTGAC ATCCACTTTG CCTTCTCTC CACAGGTGC CACTCCAGG
GTGGATRACC AGAATGACTG TAGGTGAAC GGAAGAGAG GTGTCCACAG
^ final del inserto del intrón BS en spe
^ inicio de HER2 humano desde BS en xhoI

scrFI
ncil
mspi
hpall
dsav
cauII
bsKI
bsaJI sau3AI
xmaI/pspAI
smaI mboI/ndeII sau3AI
scrFI dpnII mboI/ndeII
ncil dpnI dpnII
tsei dsav alwI rmaI alwI
fnu4HI/bsoFI
bbvI cauII nlaIV maeI nlaIV tsp509I
scfI bssKI bstVI/xhoII bstVI/xhoII
psti bsaJI bamHI bfaI bamHI ecorI
bsgI avai alwI speI alwI apoI
hndIII taqI bssHII bssKI
alul avai cac8I cauII
paer7I hhaI/cfoI asul
smI hinPI dsav
xhoI bsh1236I haeIII/palI
mnli bstUI ncil
bstUI bstUI ncil
bsh1236I haeIII/palI
mnli bstUI ncil
bsh1236I haeIII/palI
tsei bsh1236I
fnu4HI/bsoFI
mnli bbvI
acil acil
CCCCGCCGCC
GAGCGTCGTG
GGCGCGGGG

```


[illegible]

```

mspAII/nspBII
mwoI tseI
nlaIV fnu4HI/bsoFI
hgiJII bslI
bsp1286 bbvI
bmyI acII
banII bslI
cac8I
2301 GCTGCCACC CCTGTTCTCC GATGTGTAAG GGCTCCCGCT GCTGGGGAGA GAGTCTCTGAG GATTGTCAGA GCCTGACGGC CACTGCTCTGT GCGGTGGCT
CGGACGGTGG GGACAAGAGG CTACACATTC CCGAGGGCGA CGACCCCTCT CTCAAGACTC GTTACAGTCT CGGACTGCGC GTGACAGACA CGGCCACCGA
191 A C H P C S P M C K G S R C W G E S S E D C Q S L T R T V C A G G C
hinPI
hhai/cfoI
thai
fnuDII/mvni
bstOI
mwoI bsh1236I
mspi
hpaiI mwoI
cfr10I/bsrFI
2401 GTGCCCCGTG CAAGGGGCGA CTGCCCACTG ACTGCTGCCA TGAGCAGTGT GCTGCCGGCT GCACGGGGCC CAAGCACTCT GACTGCTGG CTGCTCTCCA
CACGGGCGAC GTTCCCGGT GACGGGTGAC TGACGACGGT ACTCGTCACA CGACGGCGCA CTGCGCGGG GTTCGTGAGA CTGACGGACC GGACGGAGGT
225 A R C K G P L P T D C C H E Q C A A G C T G P K H S D C L A C L H
mspAII/nspBII
mwoI tseI
nlaIV fnu4HI/bsoFI
hgiJII bslI
bsp1286 bbvI
bmyI acII
banII bslI
cac8I
2301 GCTGCCACC CCTGTTCTCC GATGTGTAAG GGCTCCCGCT GCTGGGGAGA GAGTCTCTGAG GATTGTCAGA GCCTGACGGC CACTGCTCTGT GCGGTGGCT
CGGACGGTGG GGACAAGAGG CTACACATTC CCGAGGGCGA CGACCCCTCT CTCAAGACTC GTTACAGTCT CGGACTGCGC GTGACAGACA CGGCCACCGA
191 A C H P C S P M C K G S R C W G E S S E D C Q S L T R T V C A G G C
hinPI
hhai/cfoI
thai
fnuDII/mvni
bstOI
mwoI bsh1236I
mspi
hpaiI mwoI
cfr10I/bsrFI
2401 GTGCCCCGTG CAAGGGGCGA CTGCCCACTG ACTGCTGCCA TGAGCAGTGT GCTGCCGGCT GCACGGGGCC CAAGCACTCT GACTGCTGG CTGCTCTCCA
CACGGGCGAC GTTCCCGGT GACGGGTGAC TGACGACGGT ACTCGTCACA CGACGGCGCA CTGCGCGGG GTTCGTGAGA CTGACGGACC GGACGGAGGT
225 A R C K G P L P T D C C H E Q C A A G C T G P K H S D C L A C L H

```

[illegible]

xcmI sau3AI scrFI sau96I
 scrFI mboI/ndeII mvaI nlaIV
 mvaI dpnII ecorII avaiI
 ecorII dpnI dsaV asuI
 dsaV bstYI/xhoII bstNI sandI
 bstNI fnu4HI/bsaFI bssKI ppumI
 bssKI bbvI bglII nlaIV
 cac8I mspI ecoO109I/draII tspRI
 mboII nlaIV hpaII aluI bsmFI mnlI tspRI
 2801 CAGTGCCAAT ATCCAGGAGT TTGCTGGGTG CAAGAAGATC TTGGGAGGCC TGGCATTTCT GCCGAGAGC TTTGTATGGG ACCAGCGCTC CAACACTGCC
 GTCACGGTTA TAGGTCTCA AACGACCGAC GTTCTTCTAG AAACCTCGG ACCGTAAAGA CGGCTCTCG AACTACCCC TGGGTCCGAG GTTGTGACGG
 358 S A N I Q E F A G C K K I F G S L A F L P E S F D G D P A S N T A
 sau3AI mspI hpaII haeIII/palI ddeI bpuAI
 pleI hinfI mboII dpnI maeIII eaeI cfrI mnlI bbsI
 bsmAI earI/ksp32I bsteII ddeI nlaIII cac8I drdI hgaI
 2901 CCGCTCCAGC CAGACAGCT CCAAGTGTCT GAGACTCTGG AAGAGATAC AGGTTACCTA TACATCTCAG CATGGCCGGA CAGCTGCTCT GACCTCAGCG
 GCGGAGTCTG GTCTCGTGA GGTTCACAAA CTCTGAGACC TTCTTAGT TCCATGGAT ATGTAGTGT GTACCGGCT GTCCGACGGA CTGGAGTCTCG
 391 P L Q P E Q L Q V F E T L E E I T G Y L Y I S A W P D S L P D L S V
 bsmFI hinPI hhaI/cfoI
 scrFI nlaIV hhaI/cfoI
 nclI nari kasi
 mspI hinII/acyI
 hpaII hgiCI
 dsaV haeII
 tsp509I eheI
 ecoRI bani
 apoI ahaiI/bsaHI mwoI bslI
 3001 TCTTCCAGAA CCGCAAGTA ATCCGGGGAC GAATTTCTCA CAATGGCGCC TACTCGCTGA CCTTGAAGG GCTGGGCATC AGCTGGCTGG GGCTGCCTC
 GCGAGTCTT GTTCCAGT TAGGCCCCCTG CTTAAGACGT GTTACCGGG ATGAGCACT GGCAGCTTC CGACCCGTAG TCGACCGACC CCGACCGGAG
 425 F Q N L Q V I R G R I L H N G A Y S L T L Q G L G I S W L G L R S
 alwNI cauII tsp509I eheI bani ahaiI/bsaHI mwoI bslI mspAI/nspBII fnu4HI/bsaFI hinPI hhaI/cfoI tseI
 alw26I/bsmAI bssKI apoI hpaII hhaI/cfoI pvuII mspAI sfanI aluI mwoI bbsI tspRI
 mboII bspMI bsaII hpaII hgiCI haeII eheI bani ahaiI/bsaHI mwoI bslI mspAI/nspBII fnu4HI/bsaFI hinPI hhaI/cfoI tseI
 mboII bspMI bsaII hpaII hgiCI haeII eheI bani ahaiI/bsaHI mwoI bslI mspAI/nspBII fnu4HI/bsaFI hinPI hhaI/cfoI tseI

```

sau96I
avaII
asuI
nlaIV
scrFI
draIII mvaI
mwoI bsp1286 bsmFI
bstAPI bmyI ecorII
hgiAI/aspHI dsav
bsp1286 nlaIV bstNI
bsiHKAi hgiCI bssKI
bmyI bani bsaJI
apali/snoI apyI
alw44I/snoI bsaJI aluI nlaIV acii
mnII
sau96I foki
haeIII/palI
asuI bstF5I
mnII
ddei bsri tspRI bsri mnII
3101 ACTGAGGGAA CTGGGCAGTG GACTGGCCCT CATCCACCAT AACACCCACC TCTGCTTCGT GCACACGGTG CCTGGGACC AGCTTTTCG GAACCCGAC
TGACTCCCTT GACCCCTCAC CTGACCGGGA GTAGGTGTA TTGTGGGTGG AGACGACCA CGTGTGCCAC GGGACCTCTG TCAGAAAGC CTGGGGCGTG
458 L R E L G S G L A L I H H N T H L C F V H T V P W D Q L F R N P H

sau96I
pspO
nlaIV
hgiJ
bspI
bmyI
bani
scrFI
mvaI
ecorII
dsav
bstNI
bssKI
bsaJI
apyI
sau96I
avaII asuI
asuI apaI
nlaIV ecoII
TGGGTCCAG
3201 CAAGCTCTGC TCCACACTGC CAACCGGCA GAGGACGAGT GTGTGGCGCA GGGCTGGCC TGCCACACG TGTGCCCGCG AGGCACTGC TGGGTCCAG
GTTCGACAG AGGTGTGACG GTTGGCGCGT CTCCTGCTCA CACACCCGT CCGGACCGG ACGGTGGTGC ACACGGCGG TCCCGTGACG ACCCCAGTC
491 Q A L L H T A N R P E D E C V G E G L A C H Q L C A R G H C W G P G

cambio de secuencia de Coussens a Yamamoto

```

[illegible]

[illegible]

```

sau3AI      hinPI      mboI/ndeII
mboI/ndeII  hhaI/cfoI  dpnII
nlaIV      bstVI/xhoII
bamHI      acII      esp3I      mnlI
dsv         bstNI      sfanI dpnI      bsmBI      ddeI
bsSKI      mami alwI      bsmAI      aluI      hphI
apyI      bsaBI alwI      bsmAI      aluI      hphI
3801 CTGCAGGAAA CGGAGCTGGT GGAGCGCTG ACACCTAGCG GACCGATGCC CAACGAGCGG CAGATGCGGA TCCTGAAAGA GACGAGCTG AGGAAGGTGA
GACGTCTCTT GCCTCGACCA CCTCGCGAC TGTGATCGC CTGCTAGCG GTTGTCGCG GTCTAGCCT AGGACTTTCT CTGCTCGAC TCCTTCCACT
691 L Q E T E L V E P L T P S G A M P N Q A Q M R I L K E T E L R K V K

bsII
sau3AI      mboI/ndeII
dpnII      dpnI      mscI/balI
alwI      nlaIV      haeI
bstVI/xhoII  bamHI      eaeI
tspRI
tsp509I cfrI mslI
apoI bsrI haeIII/palI      mnlI
3901 AGGTGCTGG ATCTGGCGCT TTGGGACAG TCTACAAGG CATCTGGATC CCTGATGGG AGAATGTGAA AATTCAGTG GCCATCAAG TGTGAGGGA
TCCACGACC TAGACCGGGA AAACCGTGC AGATGTCCC GTAGACCTAG GGACTACCCC TCCTACACTT TTAAGGTAC CGTAGTTTC ACAACTCCCT
725 V L G S G A F G T V Y K G I W I P D G E N V K I P V A I K V L R E

nlaIV      mwoI
hgiJII      bspI286
bmyI      bmlI      ndeI      bsmAI      bgII      sfanI
4001 AAACACATCC CCCAAGCCA ACAAGAAAT CTTAGACGAA GCATACGTGA TGGTGGTGT GGGTCCCCA TATGTCTCCC GCCTCTGGG CATCTGCCCTG
TTGTGTAGG GGGTTTCGGT TGTTCCTTA GAATCTGCTT CGTATGCTT ACCGACCACA CCCGAGGGGT ATACAGAGGG CGGAAGACCC CATACGCGAC
758 N T S P K A N K E I L D E A Y V M A G V G S P Y V S R L L G I C L

```



```

mspI
hpaII
naeI/ngoMI
cfr10I/bsrFI
cac8I
sgraI
acil acil hphI mslI
bpmI/gsuI
4401 CTGGAGTCCA TTCTCCCGG GCGGTTCACC CACCAGAGTG ATGTGTGGAG TTATGGTGTG ACTGTGTGG AGCTGATGAC TTTTGGGGCC AACCTTACG
GACCTCAGGT AAGAGGGCGC CGCCAAGTGG GTGGTCTCAC TACACACGTC AATACACAC TGACACACCC TCGACTACTG AAAACCCCGG TTTGGAATGC
891 L E S I L R R R R F T H Q S D V W S Y G V T V W E L M T F G A K P Y D

haeIII/palI
sau96I
asuI
nlaIV
bslI
tsp45I
maeIII
aluI
acil hphI mslI
4501 ATGGGATCCC AGCCCGGGAG ATCCCTGACC TGCTGGAAAA GGGGGAGCGG CTGCCCCCAGC CCCCCTCTG CACCATTGAT GTCTACATGA TCATGGTCAA
TACCCTAGG TCGGGCCCTC TAGGACTGG ACGACCTTTT CCCCTCGGC GACGGGGTGC GGGGGTAGAC GTGGTAACTA CAGATGTACT AGTACCAGTT
925 G I P A R E I P D L L E K G E R L P Q P P I C T I D V Y M I M V K

scrFI
ncil
mspI
hpaII
dsav
cauII
bssKI
xmaI/pspAI
bslI smaI
sau3AI scrFI
mboI/ndeII
dpnII ncil
dpnI dsav sau3AI
alwI cauII mboI/ndeII
nlaIV bssKI dpnII
bstYI/xhoII dpnI
bamHI bsaJI alwI bspMI
alwI avai bstYI/xhoII
4501 ATGGGATCCC AGCCCGGGAG ATCCCTGACC TGCTGGAAAA GGGGGAGCGG CTGCCCCCAGC CCCCCTCTG CACCATTGAT GTCTACATGA TCATGGTCAA
TACCCTAGG TCGGGCCCTC TAGGACTGG ACGACCTTTT CCCCTCGGC GACGGGGTGC GGGGGTAGAC GTGGTAACTA CAGATGTACT AGTACCAGTT
925 G I P A R E I P D L L E K G E R L P Q P P I C T I D V Y M I M V K

```

```

sau96I
sandI
scrFI
mvaI nlaIV
ecorII
dsav avaiI
bstNI
bssKI
bsaJI
apyI asuI
haeIII/pali
msci/bali
haeI ppuMI
haeI nlaIV haeII bslI
tsp509I eaeI nlaIV haeII bslI
ecorI nlaIII eco0109I/draII foki
apoI acil cfri bsmFI afeI/eco47III bstF5I
CTGAATTCTC CCGCATGGCC AGGAGACCCC AGCGCTTTGT GGTCATCCAG
TACAACCTAC TRACTGAGAC TTACAGCCGG TTCTAAGGCC CTCAACACCA GACTTAAGAG GCGTACCAG TCCCTGGGG TCGGAACA CCAGTAGGTC
958 C W M I D S E C R P R F R E L V S E F S R M A R D P Q R F V V I Q

foki pleI haeIII/pali
bstF5I hinfi eaeI tfii
AATGACTCTG AATGTCGGCC AGATTCCGG GAGTTGGTGT CTGAATTCTC CCGCATGGCC AGGAGACCCC AGCGCTTTGT GGTCATCCAG
TACAACCTAC TRACTGAGAC TTACAGCCGG TTCTAAGGCC CTCAACACCA GACTTAAGAG GCGTACCAG TCCCTGGGG TCGGAACA CCAGTAGGTC
958 C W M I D S E C R P R F R E L V S E F S R M A R D P Q R F V V I Q

sau96I
haeIII/pali
asuI
sau96I
pspOMI/bsp120I
nlaIV
hgiJII
bsp1286
bmyI
banII
asuI bsmFI
apal bstXI styI
apal bsrI bsaJI
TGGGCCCCAGC CAGTCCCTTG GACAGACCT TCTACCGCTC ACTGCTGGAG GACGATGACA TGGGGACCT GTGGATGCT GAGGATATC
TTACTCTGA ACCCGGTG GTACAGGAAC CTGCTGTGA AGATGGCAG TGACACCTC CTCTACTGT ACCCCCTGA CCACCTAGCA CTCCTCATG
991 N E D L G P A S P L D S T F Y R S L L E D D D M G D L V D A E E Y L

scrFI
mvaI
ecorII
dsav
bstNI
bssKI
apyI
sexAI
sau96I
avaII
ppuMI
nlaIV
sfanI
eco0109I/draII mnlI
bsmFI foki ddel
nlaIII asuI bstF5I bseRI
nlaIII asuI
TGGGACCT TCTACCGCTC ACTGCTGGAG GACGATGACA TGGGGACCT GTGGATGCT GAGGATATC
TTACTCTGA ACCCGGTG GTACAGGAAC CTGCTGTGA AGATGGCAG TGACACCTC CTCTACTGT ACCCCCTGA CCACCTAGCA CTCCTCATG
991 N E D L G P A S P L D S T F Y R S L L E D D D M G D L V D A E E Y L

```

scrFI
ncII
nsPI
hpaiI
dsav
cauII
bsSKI
bsLI
xmaI/pspAI
smaI
scrFI
ncII
dsav
cauII
bsSKI
bsaJI
mwoI mwoI
bsLI bsaJI hinPI
alwNI bsLI avai hnaI/cfoI
mboII alw26I/bsmAI haeII nlaIII
GCAGGGCTTC TTCTGTCCAG ACCCTGCCCC GGGCGTGGG GGCATGTGCC ACCACAGGCA CCGCAGCTCA TCTACCAGGA GTGGCGGTGG
acc65I asp718 hgiCI bani
ppuMI rlaIV
ecooI
ACCATGGGTT CGTCCCAG AGACAGATC TGGGACGGG CCGCGACCC CCGTACCAGG TGGTGTCGT GCGTCCAGT AGATGGTCT CACCGCACCC

1025 V P Q Q G F F C C P D P A P G A G G M V H R H R S S S T R S G G G

bsmaI
xcml
scrFI
mval
ecoRII
sau96I bsaI
nlaIV dsav
haeII/pali
mnlI asuI bstNI
bseRI bssKI
mboII ecoO109I/draII
banII banII eari/ksp632I apyI
nlaIV gsuI eco57I mnlI bsaJI
bpml/gsuI
hgiJII bsp1286 bmyI
rmai bani
maei
bfai bpml/gsuI
sau96I avai
asui
gagactgt CTAGGCTGG AGCCCTCTCA AGAGGAGGCC CCCAGGTCTC CACTGGCACC CTCGGAAGG GCTGGCTCCG ATGATTTCG TGCTGACTGT
cctcgactgt GATCCGACC TCGGGAGCT TCTCTCCGG GGGTCCAGAG GTGACCGTGG GAGGCTTCCC CCACCGAGGC TACATAAAT ACCACTGGAC

4901

1058 D L T L G L E P S E E A P R S P L A P S E G A G S D V F D G D L

```

sau96I
nlaIV
avaII
rsal
  csp6I mnlI
    scfI aciI tspRI ppuMI ddeI
      mnlI mspAlI/nspBII eco0109I/draII mnlI bsmAI
        CCTCTACAG CGGTACAGT AGNACCCAC AGTACCCCTG CCCTCTGAGA
          CCTTACCCCG GTCGGTTCC CCACGTTTCG GAGGGTGTG TACTGGGTC GAGAGATGC TCCATGTCAC TCCTGGGGTG TCATGGGGAC GGGAGACTCT
1091 G M G A A K G L Q S L P T H D P S P L Q R Y S E D P T V P L P S E T

tseI styI tseI
fnu4HI/bsoFI fnu4HI/bsoFI
bbvI bsaJI bbvI mnlI nlaIII
5001 GGAATGGGG CAGCCAAGG GCTGCAAGC CTCGCCAC ATGACCCAC TACTGGGTC TACTGGGTC GAGGGTGTG TACTGGGTC GAGAGATGC TCCATGTCAC TCCTGGGGTG TCATGGGGAC GGGAGACTCT
CCTTACCCCG GTCGGTTCC CCACGTTTCG GAGGGTGTG TACTGGGTC GAGAGATGC TCCATGTCAC TCCTGGGGTG TCATGGGGAC GGGAGACTCT
1091 G M G A A K G L Q S L P T H D P S P L Q R Y S E D P T V P L P S E T

tseI
fnu4HI/bsoFI
bbvI
scfI
pstI
bsgI
bspMI
tail
maeII
5101 CTGATGGCTA CGTTGCCCGG CTGACCTGCA GCCCCAGCC TGAATATGTG AACGAGCAG ATGTTGGCC CCAGCCCTT TCGCCCCGAG AGGCCCTCT
GACTACCGAT GCACGGGGG GACTGGAGT CGGGGTCCG ACTTATAC ACTTATAC TTGTCGTC TACAAGCGG GTTCGGGGA AGCGGGCTC TCCCGGAGA
1125 D G Y V A P L T C S P Q P E Y V N Q P D V R P Q P P S P R E G P L

scrFI
mvaI
ecoRII
dsaV
bstNI
bssKI
bsaJI
apvI
bsaJI mboII
tail
maeII
nlaIV
hgiCI
bani
5201 GCCTGCTGCC CGACCTGCTG GTGCCACTCT GGAAGGGCC AAGACTCTCT CCCAGGGGA GAATGGGTC GTCAGAGC TTTTTCCTT TGGGGGTGCC
CGGACGACGG GCTGGACGAC CACGTGAGA CCTTCCCG TTCTGAGA TTCTGAGA GGGTCCCTT CTACCCAG CAGTTCTGC AAAACGAA ACCCCACGG
1158 P A A R P A G A T L E R A K T L S P G K N G V V K D V F A F G G A

tseI
fnu4HI/bsoFI nlaIV
bbvI hgiCI
cac8I mwoI bspMI bani
5201 GCCTGCTGCC CGACCTGCTG GTGCCACTCT GGAAGGGCC AAGACTCTCT CCCAGGGGA GAATGGGTC GTCAGAGC TTTTTCCTT TGGGGGTGCC
CGGACGACGG GCTGGACGAC CACGTGAGA CCTTCCCG TTCTGAGA TTCTGAGA GGGTCCCTT CTACCCAG CAGTTCTGC AAAACGAA ACCCCACGG
1158 P A A R P A G A T L E R A K T L S P G K N G V V K D V F A F G G A

```

[illegible]

[illegible]

[illegible]

	6001	TGCCACACG	CCTTGTCTTA	ATAAAATAA	GTTGCATCAT	TTTGTCAGAC	TAT	xmaI
		ACGGGTGGTC	GGAACAGGAT	TATTTTAATT	CAACGTAGTA	AAACAGACTG	AT	maeI
								bfaI
				tsp509I	sfiNI	ahdI/e		
				tru9I				
				mseI				

[illegible]

```

scrFI
mvaI
ecorII
dsav
bstNI
bssKI
apyI
    haeIII/palI
msci/balI
    haeI
    eaeI
        hphI
        cfrI
        hphI
        hphI
        ddel
        dphI
        hphI
        mboI/ndeII
        saulAI
        dpnII
        haeI
        bstXI
        styI haeIII/palI
        bsaJI mnlI
        tsp509I
        6301 GGGGTTTCAC CATATTGGCC AGGCTGTCT CCAACTCCTA ATCTCAGGTG ATCTACCCAC CTGGCTCC CAAATTGCTG GGATTACAGG CGTGAACCAC
        CCCCCAAGTG GTATAACCGG TCCGACCAGA GGTGAGGAT TAGAGTCCAC TAGATGGGTG GAACCGGAGG GTTTAACGAC CCTAATGTCC GCACCTGGTG
        mspI
        cfrI0I/bsrFI
        bsaWI
        styI sau96I hpaII
        ncoI haeIII/palI
        dsal asuI ageI
        bsaJI pflMI
        bsmFI
        6401 TGCTCCCTTC CCTGTCCCTC TGATTTTAA ATAACATATAC CACGAGGAGG AGCTCCAGAC ACAGCATAGG CTACCTGCCA TGGCCCAACC GGTGGGACAT
        ACCGAGGAAG GGACAGGAAG ACTAAATTT TATTGATATG GTGTCCTCC TGCAGGTCTG TGTCGTATCC GATGACGGT ACCGGGTTGG CCACCTGTGA
        hgiAI/aspHI
        saulAI
        mboI/ndeII
        tru9I
        dpnII bspI286
        dpnI bsiHKAI
        tsp509I
        pvuI/bspCI
        msei
        nlaIII
        mcrI
        bmyI
        aseI/asnI/vspI
        bsiEI
        apaII/snoI
        rcaI
        apoI
        saul96I
        avaiI
        asuI
        mwoI
        mnlI
        nlaIII
        ddel
        sfaNI
        tsp509I
        alw44I/snoI
        bspHI
        tsp509I
        6501 TTGAGTTGCT TGCTTGGCAC TGTCCTCTCA TGGGTTGGT CCACTCAGTA GATGCTGTT GAATTACGAT CGGTGCACAT TAATTCATGA AATTCGTAAT
        AACTCAACGA ACGAACCGTG ACAGGAGAGT ACGCAACCCA GGTGAGTCAT CTACGGACAA CITTAATGCTA GCCACGTGA ATTAAGTACT TTAAGCATTA
        ^ inicio del conector 2
        ^ fin del conector

```

[illegible]

[illegible]

alwNI
 alw26I/bsmAI
 tseI
 fnu4HI/bscFI
 bbvI
 tseI bsrI
 bsrI fnu4HI/bscFI maeIII
 tspRI bbvI tspRI
 maeIII smlI
 pleI
 hinfi
 dsav
 cauII
 bssKI
 maeIII
 CGGTAAGTAT CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCCCCAC TGCACGAGC CACTGGTAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT
 7301 GCCATTGATA GCAGRACTCA GGTGGGCCA TTCTGTGCTG AATAGCGGTG ACCGTGCTCG GTGACCATG TCTAATCGT CTCGTCCAT ACATCCGCCA
 maeIII
 bsrI
 haeIII/palI
 haeI
 scfI
 GGTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TAGGCCTACA CTAGAAGGAC AGTATTGGT ATCTCGGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG
 7401 CGATGTCTCA AGAAGTTCAC CACCGGATTG ATGCGGATGT GATCTTCCCTG TCATAACCA TAGACGCGAG ACGACTTCGG TCAATGGAAG CCTTTTCTC
 mspI
 hpall
 sau3AI
 mboI/ndeII
 dpnII
 dpnI
 alwI
 aluI
 TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGA AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAGGAT CTCAGAAGA
 7501 AACCATCGAG AACTAGGCGG TTTGTTTGGT GCGGACCATC GCCACCAAAA AACAAACGT TCGTCGTCTA ATGCGCGGTCT TTTTTCCTA GAGTTCTCT
 sau3AI
 mboI/ndeII
 dpnII
 dpnI
 alwI
 aluI
 TCTTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAGCTCAC GTTAAGGAT TTTGGTCATG AGATATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC
 7601 AGGAAACTAG AAAAGATGCC CCAGACTGCG AGTCACCTTG CTTTGTAGTG CAATCCCTA AAACACAGTAC TCTAATAGTT TTTCTCTAGAA GTGGATCTAG

[illegible]

sau3AI
mboI/ndeII
dpnII
dpnI
nlaIII
maeIII alwI nlaIII
aciI aluI
sau96I
avaII
asuI
8101 GCTCGTCGTT TGGTATGGCT TCATTACAGT CCGGTCCCA ACATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCAT GTTGTCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG
CGAGCAGCA ACCATACCA AGTAAGTCGA GGCCAAGGT TGCTAGTCC GCTCAATGTA CTAGGGGGTA CAACAGGTTT TTTCGCCAAT CGAGGAAGCC

sau3AI
mboI/ndeII
dpnII
dpnI
nlaIII
maeIII alwI nlaIII
aciI aluI
sau96I
avaII
asuI
8201 TCCTCCGATC GTTGTCAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC GCTAAGATGC
AGGAGGCTAG CAACAGTCTT CATTCACCG CCGTCACAT AGTCACAT CATTCAACCG CCGTCACAT AGTCACAT CATTCAACCG CCGTCACAT AGTCACAT CATTCAACCG

sau3AI
mboI/ndeII
dpnII
dpnI
nlaIII
maeIII alwI nlaIII
aciI aluI
sau96I
avaII
asuI
8301 TTTTCTGTGA CTGGTCAGTA CTCRACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGCGACCG AGTTGCTCTT GCCCGGCTC ATCAGGGAT AATACCGCGC
AAAAGACACT GACCACTCAT GAGTTGGTTC AGTAAGACTC TTATCACATA CCGCGCTGGC TCAACGAGAA CCGCGCGCAG TAGTGCCTTA TTATGGCGCG

sau3AI
mboI/ndeII
dpnII
dpnI
nlaIII
maeIII alwI nlaIII
aciI aluI
sau96I
avaII
asuI
8401 CACATAGCAG AACTTTTAAA GTGCTCATCA TTGGAACG TTCTTCGGG CGAAACTCT CAAGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGT CGATGTAACC
GTGTATCGTC TTGAAATTTT CACGAGTAGT AACCTTTTGC AAGAGCCCC GCTTTTGA GTTCTAGAA TGCGCAGAAC TCTAGTCAA GCTACATTGG

hgaiI/asplI
bsp1286
bsiHKAI
bmyI
apaLI/snoI
alw44I/snoI
bssSI
8501 CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAAAGAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGGAAATAAGG
GTGAGCACGT GGGTTGACTA GAACTGCTAG AAAATGAAG TGGTGGCAA GACCCACTCG TTTTGTGCTT TCCGTTTTAC GCGGTTTTTT CCCTATTATCC

eco57I
mboII
sau3AI
mboI/ndelI
dpnII
dpnI
sfaNI
hphI
hphI
acil
fnu4HI/bsOFI
8601 GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATCTC TTCTTTTTC AATATTATG AAGCATTTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGATACATA TTTGAATGTA
CGCTGTGCTT TTCAACTTA TGAGTATGAG AAGGAAAAAG TTATAATAAC TTCGTAATA GTCCCAATAA CAGAGTACTC GCGTATGTAT AACTTTACAT

malI
earI/ksp632I
sspl
mboII
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
acil
nlaiv hhai/cfoI
8701 TTTAGAAAA TAAACAAATA GGGTTCGCG CACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGAGC TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTA CCTATAAAAA
AATCTTTTT ATTTGTTTTT CCCCAGGCG CGCTAAAGG GCGTTTTTAC GGTGGACTGC AGATCTTTG GTAATAATAG TACTGTAAAT GGAATTTTT

tail
maeII
hinII/acyI
ahaiI/bsaHI
aatII ddeI
nlaIII
rcal
bspHI
tru9I
mseI
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

sau96I
haeIII/palI
eco0109I/draII
mnlI
bssSI asuI
bbsI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGAGC GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACCTCGAGGG CCTCTGCCAG

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
mnlI hhai/cfoI hphI
hphI mnlI
nspHI alui hpalI
nlaIII bssKI
tsp45I
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGGCTT TCGGTATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGGA A

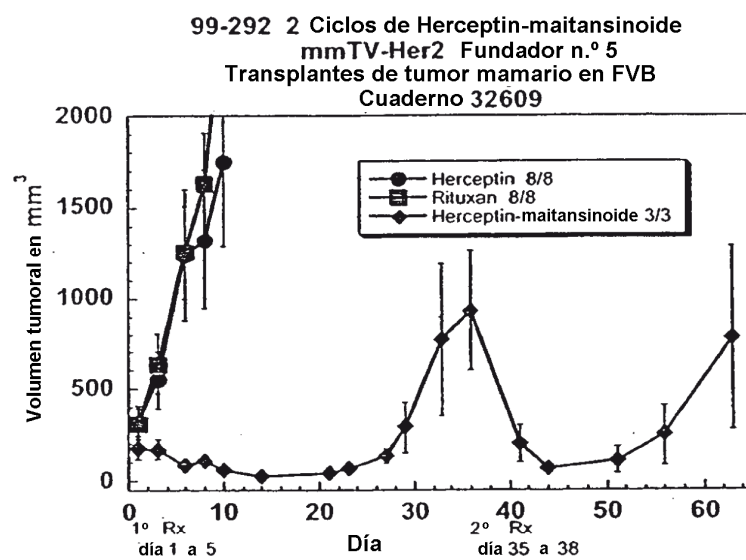
[illegible]

```

scrFI
mvaI
ecorII
dsv
bstNI
bssKI
bsaJI
tseI
fnu4HI/bsaFI tru9I
bbvI
maeIII
tspRI
bsrI
haeIII/palI
eaeI
cfrI
tail
tsp45I
maeIII
bsrI
maeII
bsrI
maeIII
CAGGTTTTC CAGGTTTTC CCAGTCACCA CGTTGTAAAA CGACGGCCAG TGCC
9201 GTGCTGCAAG GCGATTAACT TGGGTAACGC CAGGTTTTC CCAGTCACCA CGTTGTAAAA CGACGGCCAG TGCC
CACGACGTC CGCTAATTCA ACCATTGCG GTCCAAAAG GGTGAGTGCT GCACATTTT GTGCGCGTC ACGG

```

Figura 5



Dominio variable pesado

		10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGT	SVKISCKAS	[GFTFTD	YTM	D] WVKQS
	** ** *	* * ** *			* *
574	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLSCAAS	[GFTFTD	YTM	D] WVRQA
			** * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLSCAAS	[GFTFSS	YAMS]	WVRQA
		50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG	[DVNPNSGGSIYN	QRFKG]	KASLTVD	RSSRIVYM
	* * **			*** *	**** *
574	PGKGLEWVA	[DVNPNSGGSIYN	QRFKG]	RFTLSVDR	SKNTLYL
		***** ** *	*****	* * *	
hum III	PGKGLEWVA	[VISGDGGSTYYA	DSVKG]	RFTISRDN	SKNTLYL
	abc	90	100ab	110	
2C4	ELRSLTFEDTAVYY	CAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTL	TVSS
	*** **			**	
574	QMNSLRAEDTAVYY	CAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTL	TVSS

hum III	QMNSLRAEDTAVYY	CAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTL	TVSS

Figura 6

Dominio variable ligero

		10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIM	STSVGDRVSITC	[KASQDV	SIGVA]	WYQQRP
	**	**** *	*		*
574	DIQMTQSPSSLSAS	VGDRVITC	[KASQDV	SIGVA]	WYQQKP
			*	** ***	
hum κI	DIQMTQSPSSLSAS	VGDRVITC	[RASQSI	SNYLA]	WYQQKP
		50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY	[SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	**		* *		* *
574	GKAPKLLIY	[SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
		* *****			
hum κI	GKAPKLLIY	[AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
		90	100		
2C4	EDLAVYYC	[QQYIYPYT]	FGGGTKLEIKRT		
	* *		* *		
574	EDFATYYC	[QQYIYPYT]	FGQGTKVEIKRT		
		*** *			
hum κI	EDFATYYC	[QQYNLPWT]	FGQGTKVEIKRT		

Figura 7