

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 140**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2005 E 05818254 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 1771482**

54 Título: **Composición de anticuerpos de HER2**

30 Prioridad:

22.07.2004 US 590202 P

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

12.11.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KAO, YUNG-HSIANG y
VANDERLAAN, MARTIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 521 140 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

Composición de anticuerpos de HER2

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo de HER2 de especie principal que se une con el dominio II de HER2, y una variante de secuencia de aminoácidos del mismo que comprende una extensión líder amino-terminal. La invención también se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden la composición, y usos terapéuticos para la composición. La invención es como se define en las reivindicaciones

Antecedentes de la invención**Anticuerpos de HER2**

15 La familia HER de tirosina quinasas receptoras son importantes mediadores del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia del receptor incluye cuatro miembros diferentes incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1 o HER1), HER2 (ErbB2 o p185^{neu}), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).

20 EGFR, codificado por el gen *erbB1*, se ha implicado de forma causativa en los tumores malignos humanos. En particular, se ha observado expresión aumentada de EGFR en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago así como glioblastomas. La expresión aumentada del receptor EGFR se ha asociado con frecuencia con la producción aumentada del ligando de EGFR, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), por las mismas células tumorales dando como resultado la activación del receptor por una ruta estimuladora autocrina. Baselga y Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64: 127-154 (1994). Se han evaluado anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR o sus ligandos, TGF- α y EGF, como agentes terapéuticos en el tratamiento de dichos tumores malignos. Véase, por ejemplo, Baselga y Mendelsohn., mencionado anteriormente; Masui *et al* *Cancer Research* 44: 1002-1007 (1984); y Wu *et al.* *J. Clin. Invest.* 95: 1897-1905 (1995).

30 El segundo miembro de la familia HER, p185^{neu}, se identificó originalmente como el producto del gen transformante de neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. La forma activada del proto-oncogén *neu* resulta 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 ováricos y se correlaciona con un mal pronóstico (Slamon *et al.*, *Science*, 235: 177-182 (1987); Slamon *et al.*, *Science*, 244: 707-712 (1989); y Patente de Estados Unidos N° 4.968.603). Hasta la fecha, no se ha presentado ninguna mutación puntual análoga a la del proto-oncogén *neu* para tumores humanos. También se ha observado sobreexpresión de HER2 (frecuentemente pero no uniformemente debida a la amplificación génica) en otros carcinomas incluyendo carcinomas del estómago, endometrio, glándula salivar, 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); Fukushige *et al.*, *Mol Cell Biol*, 6: 955-958 (1986); Guerin *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: 254-257 (1990); Aasland *et al.* *Br. J. Cancer* 57: 358-363 (1988); Williams *et al.* *Pathobiology* 59: 46-52 (1991); McCann *et al.*, *Cancer*, 65: 88-92 (1990). HER2 puede sobreexpresarse en cáncer de próstata (Gu *et al.* *Cancer Lett.* 99: 185-9 (1996); Ross *et al.* *Hum. Pathol.* 28: 821-33 (1997); Ross *et al.* *Cancer* 79: 2162-70 (1997); y Sadasivan *et al.* *J. Urol.* 150: 126-31 (1993)).

Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos proteicos p185^{neu} de rata y HER2 humano. Drebin y colaboradores han inducido 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 documento WO94/22478. Drebin *et al* *Oncogene* 2: 273-277 (1988) indica que las mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones distintas de p185^{neu} da como resultado efectos antitumorales sinérgicos en células NIH-3T3 transformadas con *neu* implantadas en ratones desnudos. Véase también Patente de Estados Unidos 5.824.311 presentada el 20 de octubre de 1998.

55 Hudziak *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 9(3): 1165-1172 (1989) describe la generación de un panel de anticuerpos de HER2 que se caracterizaron usando la línea celular de tumor de mama humano SK-BR-3. Se determinó la proliferación celular relativa de las células SK-BR-3 después de exposición a los anticuerpos por tinción con violeta cristal de las monocapas después de 72 horas. Usando este ensayo, se obtuvo inhibición máxima con el anticuerpo llamado 4D5 que inhibía la proliferación celular en un 56 %. Otros anticuerpos en el panel redujeron la proliferación celular en un menor grado en este ensayo. Se descubrió además que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba líneas celulares tumorales de mama que sobreexpresaban HER2 a los efectos citotóxicos del TNF- α . Véase también Patente de Estados Unidos N° 5.677.171 presentada el 14 de octubre de 1997. Los anticuerpos de HER2 analizados Hudziak *et al.* se caracterizan adicionalmente 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).

5 Una versión humanizada recombinante del anticuerpo murino de HER2 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Trastuzumab o HERCEPTIN®; Patente de Estados Unidos N° 5.821.337) está clínicamente activo en pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobreexpresan HER2 que han recibido terapia antineoplásica previa extensiva (Baselga *et al.*, J. Clin. Oncol. 14: 737-744 (1996)). El trastuzumab recibió la aprobación de comercialización de la Administración de Fármacos y Alimentos el 25 de septiembre de 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2.

10 Se han descrito otros anticuerpos de HER2 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); 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); Patente de Estados Unidos 5.783.186; y Klapper *et al.* Oncogene 14: 2099-2109 (1997).

20 La exploración de homología ha dado como resultado la identificación de otros dos miembros de la familia del receptor HER; HER3 (Patentes de Estados Unidos N° 5.183.884 y 5.480.968 así como Kraus *et al.* PNAS (USA) 86: 9193-9197 (1989)) y HER4 (Solicitud de Patente EP N° 599.274; Plowman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1746-1750 (1993); y Plowman *et al.*, Nature, 366: 473-475 (1993)). Ambos de estos receptores presentan expresión aumentada en al menos algunas líneas celulares de cáncer de mama.

25 Los receptores HER se encuentran en general en diversas combinaciones en células y se cree que la heterodimerización aumenta la diversidad de respuestas celulares a diversos ligandos de HER (Earp *et al.* Breast Cancer Research and Treatment 35: 115-132 (1995)). EGFR se une con seis ligandos diferentes; el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), anfirregulina, el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), betacelulina y epirregulina (Groenen *et al.* Growth Factors 11: 235-257 (1994)). Una familia de proteínas heregulinas resultante del corte y empalme alternativo de un único gen son ligandos para HER3 y HER4. La familia de heregulina incluye heregulinas alfa, beta y gamma (Holmes *et al.*, Science, 256: 1205-1210 (1992); Patente de Estados Unidos N° 5.641.869; y Schaefer *et al.* Oncogene 15: 1385-1394 (1997)); factores de diferenciación de neu (NDF), factores de crecimiento glial (GGF); actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA); y factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF). Para una revisión, véase Groenen *et al.* Growth Factors 11: 235-257 (1994); Lemke, G. Molec. & Cell. Neurosci. 7: 247-262 (1996) y Lee *et al.* Pharm. Rev. 47: 51-85 (1995). Recientemente se han identificado tres ligandos de HER adicionales; neuregulina-2 (NRG-2) que se ha indicado que se une con HER3 o HER4 (Chang *et al.* Nature 387 509-512 (1997); y Carraway *et al.* Nature 387: 512-516 (1997)); neuregulina-3 que se une con HER4 (Zhang *et al.* PNAS (USA) 94(18): 9562-7 (1997)); y neuregulina-4 que se une con HER4 (Harari *et al.* Oncogene 18: 2681-89 (1999)) HB-EGF, betacelulina y epirregulina también se unen con HER4.

45 Aunque EGF y TGF α no se unen con HER2, EGF estimula EGFR y HER2 para formar un heterodímero, que activa el EGFR y da como resultado la transfosforilación de HER2 en el heterodímero. La dimerización y/o transfosforilación parece activar la tirosina quinasa HER2. Véase Earp *et al.*, mencionado anteriormente. De forma similar, cuando HER3 se coexpresa con HER2, se forma un complejo de señalización activo y los anticuerpos dirigidos contra HER2 son capaces de alterar este complejo (Sliwkowski *et al.*, J. Biol. Chem., 269(20): 14661-14665 (1994)). Adicionalmente, la afinidad HER3 por la heregulina (HRG) se aumenta hasta un estado de afinidad mayor cuando se coexpresa con HER2. Véase, también, Levi *et al.*, Journal of Neuroscience 15: 1329-1340 (1995); Morrissey *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1431-1435 (1995); y Lewis *et al.*, Cancer Res., 56: 1457-1465 (1996) con respecto al complejo proteico HER2-HER3. HER4, como HER3, forma un complejo de señalización activo con HER2 (Carraway y Cantley, Cell 78: 5-8 (1994)).

55 Para dirigirse a la ruta de señalización de HER, se desarrolló rhuMAb 2C4 (Pertuzumab, OMNITARG™) como un anticuerpo humanizado que inhibe la dimerización de HER2 con otros receptores HER, inhibiendo de este modo la fosforilación y activación conducidas por ligando, y la activación corriente abajo de las rutas de RAS y AKT. En un ensayo de fase I de Pertuzumab como un único agente para tratar tumores sólidos, tres sujetos con cáncer ovárico avanzado se trataron con pertuzumab. Uno tuvo una respuesta parcial duradera, y un sujeto adicional tuvo enfermedad estable durante 15 semanas. Agus *et al.* Proc Am Soc Clin Oncol 22: 192, Resumen 771 (2003).

60 El sitio de unión a antígeno de un Fab2C4 humanizado se ha estudiado usando mutagénesis de exploración aleatoria (Vajdos *et al.*, J. Mol. Biol., 320(2): 415-28, (2002)). El documento WO01/00238 describe el uso de pertuzumab para el tratamiento del cáncer de próstata. Se ha sugerido que pertuzumab y trastuzumab inhiben de forma sinérgica la supervivencia de células de cáncer de mama (Nahta *et al.*, Cancer Research, 64: 2343-2346, (2004)).

Composiciones de variantes de anticuerpo

La Patente de Estados Nº 6.339.142 describe una composición de anticuerpo de HER2 que comprende una mezcla de anticuerpo anti-HER2 y una o más variantes ácidas del mismo, en la que la cantidad de la variante o las variantes ácidas es menor de aproximadamente 25 %. El trastuzumab es el anticuerpo de HER2 ejemplificado.

Reid *et al.* Poster presentado en la conferencia de Productos Farmacéuticos Biotecnológicos Bien Caracterizados (enero de 2003) "Effects of Cell Culture Process Changes on Humanized Antibody Characteristics" describe una composición de anticuerpo IgG1 humanizado, sin nombre, con heterogeneidades N-terminales debido a combinaciones con el péptido señal VHS, glutamina N-terminal y ácido piroglutámico en la cadena pesada del mismo.

Reed *et al.* "The Ideal Chromatographic Antibody Characterization Method" Poster presentado en la Conferencia de Producción de Anticuerpos ABC (febrero de 2002) indica una extensión de VHS en la cadena pesada de E25, un anticuerpo humanizado anti-IgE.

Rouse *et al.* Poster presentado en WCBP "'Top Down' Glycoprotein Characterization by High Resolution Mass Spectrometry and Its Application to Biopharmaceutical Development" (6-9 de enero de 2004) describe una composición de anticuerpos monoclonales con heterogeneidad N-terminal resultante de restos de péptido señal ³AHS o ²HS en la cadena ligera del mismo.

En una presentación en el Encuentro de IBC (septiembre de 2000) "Strategic Use of Comparability Studies and Assays for Well Characterized Biologicals," Jill Porter analizó una forma de elución tardía de ZENAPAX™ con tres restos de aminoácidos extra en la cadena pesada del mismo.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende: (a) un anticuerpo de HER2 de especie principal que se une con el dominio II de HER2 y comprende una secuencia de aminoácidos ligera variable proporcionada como SEC ID Nº: 3 y una secuencia de aminoácidos pesada variable proporcionada como SEC ID Nº: 4; y (b) una variante de anticuerpo que comprende la especie principal de anticuerpo de HER2 y una extensión líder amino-terminal que comprende VHS- en una cadena ligera de la variante de anticuerpo, en la que del 5 % a aproximadamente el 15 % de las moléculas de anticuerpo en la composición comprenden la extensión líder amino-terminal, como se cuantifica por análisis de intercambio catiónico.

La invención se refiere además a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos en SEC ID Nº: 23, o una variante desamidada y/u oxidada de la misma, que se incluye en un anticuerpo que comprende (a) una cadena ligera que comprende ese polipéptido y (b) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 24 y una variante desamidada y/u oxidada de SEC ID Nº: 16 o SEC ID Nº: 24.

La invención también se refiere a una formulación farmacéutica que comprende la composición en un vehículo farmacéuticamente aceptable, útil para tratar el cáncer que expresa HER2 en un paciente administrando la formulación farmacéutica al paciente en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona un esquema de la estructura proteica de HER2 y secuencias de aminoácidos para los dominios I-IV (SEC ID Nº: 19-22, respectivamente) del dominio extracelular de la misma.

Las Figuras 2A y 2B representan alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los dominios ligero variable (V_L) (Fig. 2A) y pesado variable (V_H) (Fig. 2B) del anticuerpo monoclonal murino 2C4 (SEC ID Nº: 1 y 2, respectivamente); dominios V_L y V_H de la versión de 2C4 humanizado 574 (SEC ID Nº: 3 y 4, respectivamente); y marcos consenso V_L y V_H humanos (hum κ1, subgrupo kappa ligero I, humIII, subgrupo pesado III) (SEC ID Nº: 5 y 6, respectivamente). Los asteriscos identifican diferencias entre 2C4 versión 574 y el anticuerpo monoclonal murino 2C4 o entre 2C4 humanizado versión 574 y el marco conservado humano. Las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) estén entre corchetes.

Las Figuras 3A y 3B muestran las secuencias de aminoácidos de cadena ligera (SEC ID Nº: 15) y cadena pesada (SEC ID Nº: 16) de Pertuzumab. Las CDR se muestran en negrita. El resto de carbohidrato está unido con Asn 299 de la cadena pesada.

Las Figuras 4A y 4B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEC ID N: 17) y cadena pesada de Pertuzumab, incluyendo cada una secuencia peptídica señal amino-terminal intacta (SEC ID Nº: 18).

La Figura 5 representa, esquemáticamente, la unión de 2C4 en el sitio de unión heterodimérico de HER2, previniendo de este modo la heterodimerización con EGFR o HER3 activado.

La Figura 6 representa el acoplamiento de HER2/HER3 con las rutas de MAPK y Akt.

La Figura 7 compara las actividades de Trastuzumab y Pertuzumab.

Las Figuras 8A y 8B muestran espectros de masa reconstruidos de la cadena ligera (Fig. 8A) y cadena pesada

(Fig. 8B) de Pertuzumab reducido.

Las Figuras 9A y 9B representan el análisis de cromatografía de intercambio catiónico de Pertuzumab nativo (Fig. 9A) y Pertuzumab digerido con CPB (Fig. 9B).

La Figura 10 muestra análisis cromatográfico de exclusión por tamaño de Pertuzumab.

5 Las Figuras 11A y 11B muestran el análisis de CE-SDS-LIF de Pertuzumab reducido (Fig. 11A) y Pertuzumab intacto (Fig. 11B).

Las Figuras 12A y 12B representan mapas peptídicos trípticos de Pertuzumab (Fig. 12A) y mapas peptídicos de LYS-C de Pertuzumab (Fig. 12b).

La Figura 13 muestra el análisis de CE de oligosacáridos ligados a N liberados de Pertuzumab.

10 Las Figuras 14A y 14B muestran estructuras de oligosacáridos habitualmente observadas en anticuerpos IgG.

La Figura 15 representa espectros de masas MALDI-TOF de modo positivo de oligosacáridos neutros liberados de Pertuzumab.

Las Figuras 16A y 16B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEC ID N°: 13) y cadena pesada (SEC ID N°: 14) de Trastuzumab.

15 Las Figuras 17A y 17B representan una secuencia de cadena ligera de Pertuzumab variante (SEC ID N°: 23) y una secuencia de cadena pesada de Pertuzumab variante (SEC ID N°: 24).

Descripción de las realizaciones preferentes

20 I. Definiciones

La expresión “anticuerpo de especie principal” en el presente documento se refiere a la estructura de secuencia de aminoácidos de anticuerpo en una composición que es la molécula de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición. El anticuerpo de especie principal es un anticuerpo de HER2 que se une con el dominio II de HER2 y comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada variables en SEC ID N°: 3 y 4, y preferentemente comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada en SEC ID N°: 15 y 16 (Pertuzumab).

30 Un anticuerpo “variante de secuencia de aminoácidos” en el presente documento es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que difiere de un anticuerpo de especie principal.

Los ejemplos de variantes de secuencia de aminoácidos en el presente documento incluyen una variante ácida (por ejemplo, una variante de anticuerpo desamidada), una variante básica, el anticuerpo con una extensión líder amino-terminal (por ejemplo VHS-) en una o dos cadenas ligeras del mismo, anticuerpo con un resto de lisina C-terminal en una o dos cadenas pesadas del mismo, anticuerpo con uno o más restos de metionina oxidada, etc. e incluye combinaciones de variaciones de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y/o ligeras. La variante de anticuerpo de interés particular en el presente documento es el anticuerpo que comprende una extensión líder amino-terminal en una o dos cadenas ligeras del mismo, comprendiendo además opcionalmente otra secuencia de aminoácidos y/o diferencias de glucosilación en relación con el anticuerpo de especie principal.

40 Un anticuerpo de “variante de glucosilación” en el presente documento es un anticuerpo con uno o más restos de carbohidratos unidos al mismo que difieren de uno o más restos de carbohidratos unidos a un anticuerpo de especie principal. Los ejemplos de variantes de glucosilación en el presente documento incluyen anticuerpo con una estructura de oligosacáridos G1 o G2, en lugar de una estructura de oligosacárido G0, unida con una región de Fc del mismo, anticuerpo con uno o dos restos de carbohidratos unidos con una o dos cadenas ligeras del mismo, anticuerpo sin carbohidratos unidos a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, etc., así como combinaciones de dichas alteraciones de glucosilación.

50 Cuando el anticuerpo tiene una región Fc, una estructura de oligosacárido tal como la que se muestra en las Figuras 14A y 14B en el presente documento puede estar unida con una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, por ejemplo en el resto 299. Para Pertuzumab, G0 fue la estructura del oligosacárido predominante, encontrándose otras estructuras de oligosacáridos tales como G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) y G2 en cantidades menores en la composición de Pertuzumab.

55 A no ser que se indique de otro modo, una “estructura de oligosacárido G1” en el presente documento incluye estructuras G1(1-6) y G1(1-3).

60 Una “extensión líder amino-terminal” en el presente documento se refiere a uno o más restos de aminoácidos de la secuencia líder amino-terminal que están presentes en el extremo amino-terminal de una o más cadenas pesadas o ligeras cualesquiera de un anticuerpo. Una extensión líder amino-terminal ejemplar comprende o consiste en tres restos de aminoácidos, VHS, presentes en una o ambas cadenas ligeras de una variante de anticuerpo.

Un anticuerpo “desamidado” es uno en el que se han derivatizado uno o más restos de asparagina del mismo, por ejemplo a un ácido aspártico, una succinimida o un ácido iso-aspártico.

65

La "homología" se define como el porcentaje de restos en la variante de secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de homología. Se conocen bien en la técnica métodos y programas informáticos para el alineamiento. Uno de dichos programas informáticos es "Align 2", creado por Genentech, Inc., que se presentó con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

Para los fines del presente documento, "análisis de intercambio catiónico" se refiere a cualquier método por el que una composición que comprende dos o más compuestos se separa basándose en diferencias de carga usando un intercambiador catiónico. Un intercambiador catiónico generalmente comprende grupos con carga negativa, unidos covalentemente. Preferentemente, el intercambiador catiónico en el presente documento es un intercambiador catiónico débil y/o comprende un grupo funcional carboxilato, tal como la columna de intercambio catiónico PROPAC WCX-10™ vendida por Dionex.

Un "receptor HER" es una proteína tirosina quinasa receptora que pertenece a la familia del receptor HER e incluye receptores EGFR, HER2, HER3 y HER4 y otros miembros de esta familia que se identifiquen en el futuro. El receptor HER comprenderá generalmente un dominio extracelular, que puede unirse con un ligando de HER; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo-terminal que alberga varios restos de tirosina que pueden fosforilarse. Preferentemente el receptor HER es un receptor HER humano de secuencia nativa.

El dominio extracelular de HER2 comprende cuatro dominios, el Dominio I (restos de aminoácidos de aproximadamente 1-195), Dominio II (restos de aminoácidos de aproximadamente 196-319), Dominio III (restos de aminoácidos de aproximadamente 320-488) y Dominio IV (restos de aminoácidos de aproximadamente 489-630) (numeración de restos sin péptido señal). Véase Garrett *et al.*, Mol. Cell. 11: 495-505 (2003), Cho *et al.* Nature 421: 756-760 (2003), Franklin *et al.* Cancer Cell 5: 317-328 (2004) o Plowman *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 1746-1750 (1993). Véase, también, la Figura 1 en el presente documento.

Las expresiones "BrbB1", "HER1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico" y "EGFR" se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a EGFR como se desvela, por ejemplo, en Carpenter *et al.* Ann. Rev. Biochem. 56: 88T-914 (1987), incluyendo formas mutantes de origen natural del mismo (por ejemplo un EGFR mutante de delección como en Humphrey *et al.* PNAS (USA) 87: 4207-4211 (1990)). *erbB1* se refiere al gen que codifica el producto proteico de EGFR.

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

"ErbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido receptor como se desvela, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.183.884 y 5.480.968 así como en Kraus *et al.* PNAS (USA) 86: 9193-9197 (1989).

Los términos "ErbB4" y "HER4" en el presente documento se refieren al polipéptido receptor como se desvela, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de EP N° 599.274; Plowman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1746-1750 (1993); y Plowman *et al.*, Nature, 366: 473-475 (1993), incluyendo isoformas del mismo, por ejemplo, como se desvela en el documento WO99/19488, publicado el 22 de abril de 1999.

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

"Heregulina" (HRG) cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido codificado por el producto génico de herregulina como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 5.641.869 o Marchionni *et al.*, Nature,

- 362: 312-318 (1993). Los ejemplos de herregulinas incluyen herregulina- α , herregulina- β 1, herregulina- β 2 y herregulina- β 3 (Holmes *et al.*, Science, 256: 1205-1210 (1992); y Patente de Estados Unidos N° 5.641.869); factor de diferenciación *neu* (NDF) (Peles *et al.* Cell 69: 205-216 (1992)); actividad inductora de receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls *et al.* Cell 72: 801-815 (1993)); factores de crecimiento gliales (GGF) (Marchionni *et al.*, Nature, 362: 312-318 (1993)); factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho *et al.* J. Biol. Chem. 270: 14523-14532 (1995)); γ -herregulina (Schaefer *et al.* Oncogene 15: 1385-1394 (1997)). El término incluye fragmentos biológicamente activos y/o variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido de HRG de secuencia nativa tal como un fragmento de dominio de tipo EGF del mismo (por ejemplo, HRG β ₁₇₇₋₂₄₄).
- 10 Un "dímero de HER" en el presente documento es un dímero asociado de forma no covalente que comprende al menos dos receptores HER diferentes. Dichos complejos pueden formarse cuando una célula que expresa dos o más receptores HER se expone a un ligando de HER y puede aislarse por inmunoprecipitación y analizarse por SDS-PAGE como se describe en Sliwkowski *et al.*, J. Biol. Chem., 269(20): 14661-14665 (1994), por ejemplo. Los ejemplos de dichos dímeros de HER incluyen heterodímeros EGFR-HER2, HER2-HER3 y HER3-HER4. Además, el
- 15 dímero de HER puede comprender dos o más receptores HER2 combinados con un receptor HER diferente, tal como HER3, HER4 o EGFR. Otras proteínas, tales como una subunidad del receptor de citocinas (por ejemplo gp130) pueden asociarse con el dímero.
- 20 Un "sitio de unión heterodimérico" en HER2, se refiere a un región en el dominio extracelular de HER2 que entra en contacto, o forma interfase, con una región en el dominio extracelular de EGFR, HER3 o HER4 tras la formación de un dímero con el mismo. La región se encuentra en el Dominio II de HER2. Franklin *et al.* Cancer Cell 5: 317-328 (2004).
- 25 La "activación de HER" o "activación de HER2" se refiere a la activación, o fosforilación, de uno cualquiera o más receptores HER o receptores HER2. En general, la activación de HER da como resultado la transducción de señal (por ejemplo la provocada por un dominio quinasa intracelular de un receptor HER que fosforila restos de tirosina en el receptor HER o un polipéptido sustrato). La activación de HER puede estar mediada por la unión de un ligando de HER con un dímero de HER que comprende el receptor HER de interés. La unión del ligando de HER con un dímero de HER puede activar un dominio quinasa de uno o más de los receptores HER y por lo tanto da como resultado la
- 30 fosforilación de restos de tirosina en uno o más de los receptores HER y/o fosforilación de restos de tirosina en un polipéptido o polipéptidos sustrato adicionales, tales como quinasas intracelulares MAPK o Akt.
- 35 El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y específicamente abarca anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados por al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad biológica deseada.
- 40 La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen con el mismo epítipo, excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, tales como las variantes descritas en el presente documento. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque no
- 45 están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden realizarse por el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden realizarse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse también de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), por ejemplo.
- 50
- 55 Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico a u homólogo de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos N° 4,816,567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del Viejo Mundo, Simio, etc.) y secuencias de región constante humanas.
- 60
- 65 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos

Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de un fragmento o fragmentos de anticuerpo.

5 Un "anticuerpo intacto" es uno que comprende una región variable de unión a 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 humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras y comprende una estructura de oligosacárido unida a una o dos cadenas del mismo.

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

15 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a diferentes "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las estructuras subunitarias y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

25 La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo linfocitos Citolíticos Naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar en la ADCC, linfocitos NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan, FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos Citolíticos Naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* PNAS (USA) 95: 652-656 (1998).

35 Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose las PBMC y los linfocitos NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo de sangre o PBMC como se describe en el presente documento.

45 Las expresiones "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une con la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferente es uno que se une con un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase revisión M. en Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Se revisan FcR en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249 (1994)).

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

65 Los "anticuerpos nativos" son habitualmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera está unida con una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro

varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también enlaces disulfuro intracatenarios a espacios regulares. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren extensivamente en su secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por todos los dominios variables de anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denominan las regiones de marco conservados (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración en lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de lámina β . La regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de 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 de un anticuerpo con un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos de aminoácidos de una región determinante de complementariedad o "CDR" (por ejemplo 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 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 conservado" o "FR" son los restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable como se define en el presente documento.

La digestión con papaína de anticuerpos producen dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión a antígeno y aún es capaz de entrecruzarse con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. Es en esta configuración en las que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse con el antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Se produjeron originalmente fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

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

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de scFv véase Plückerthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994). Se describen fragmentos scFv de anticuerpo de HER2 en el documento WO93/16185; Patente de Estados Unidos N°

5.571.894; y Patente de Estados Unidos Nº 5.587.458.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio pesado variable (V_H) conectado con un dominio ligero variable (V_L) en la misma cadena polipeptídica ($V_H - V_L$). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se reemplazan restos de una región hipervariable del receptor por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan restos de región de marco conservado (FR) de la inmunoglobulina humana por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos de los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la 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 de HER2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 o Trastuzumab (HERCEPTIN®) como se describe en la Tabla 3 de la Patente de Estados Unidos 5.821.337; 520C9 humanizado (documento WO93/21319) y anticuerpos 2C4 humanizados como se describe en el presente documento.

Para los fines del presente documento, "Trastuzumab", "HERCEPTIN®" y "huMAb4D5-8" se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácido de cadena ligera y pesada en SEC ID Nº 13 y 14, respectivamente.

En el presente documento "Pertuzumab", "OMNITARG™" y "rhuMAb 2C4", se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácido ligera variable y pesada variable en SEC ID Nº 3 y 4, respectivamente. Cuando Pertuzumab es un anticuerpo intacto, preferentemente comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada en SEC ID Nº 15 y 16, respectivamente.

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

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferente, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso del anticuerpo como se determina por el método de Lowry y más preferentemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo de HER2 que "inhibe la dimerización de HER más eficazmente que Trastuzumab" es uno que reduce o elimina los dímeros de HER más eficazmente (por ejemplo al menos aproximadamente 2 veces más eficazmente) que Trastuzumab. Preferentemente, dicho anticuerpo inhibe la dimerización de HER2 al menos aproximadamente tan eficazmente como un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal murino intacto 2C2, un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal murino 2C4, Pertuzumab intacto y un fragmento Fab de Pertuzumab. Se puede evaluar la inhibición de la dimerización de HER estudiando los dímeros de HER directamente, o evaluando la activación de HER, o la señalización corriente abajo, que resulta de la dimerización de HER y/o evaluando el sitio de unión de anticuerpo-HER2, etc. Se describen ensayos para explorar con respecto a anticuerpos con la capacidad para inhibir la dimerización de HER más eficazmente que Trastuzumab en Agus *et al.* Cancer Cell 2: 127-137 (2002) y el documento WO01/00245 (Adams *et al.*). Como ejemplo solamente, se puede ensayar con respecto a la inhibición de la dimerización de HER, evaluando, por ejemplo, la inhibición de la formación de dímeros HER (véase, por ejemplo, Figura 1A-B de Agus *et al.* Cancer Cell 2: 127-137 (2002); y documento WO01/00245); reducción de la activación del ligando de HER de células que expresan dímeros de HER (documento

WO01/00245 y Fig. 2A-B de Agus *et al.* Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo); bloqueo de la unión del ligando de HER con células que expresan dímeros de HER (documento WO01/00245, y Fig. 2E de Agus *et al.* Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo); inhibición del crecimiento celular de células cancerosas (por ejemplo células MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D) que expresan dímeros de HER en presencia (o ausencia) de ligando de HER (documento WO01/00245 y Figs. 3A-D de Agus *et al.* Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo); inhibición de la señalización corriente abajo (por ejemplo, inhibición de la fosforilación de AKT dependiente de HRG o inhibición de la fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF α) (véase, documento WO01/00245 y Fig. 2C-D de Agus *et al.* Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo). También se puede evaluar si el anticuerpo inhibe la dimerización de HER estudiando el sitio de unión de anticuerpo-HER2, por ejemplo, evaluando una estructura o modelo, tal como una estructura cristalina, del anticuerpo unido con HER2 (véase, por ejemplo, Franklin *et al.* Cancer Cell 5: 317-328 (2004)).

El anticuerpo de HER2 puede "inhibir la fosforilación de AKT dependiente de HRG" y/o inhibir la "fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF α " más eficazmente (por ejemplo al menos 2 veces más eficazmente) que Trastuzumab (véase Agus *et al.* Cancer Cell 2: 127-137 (2002) y documento WO01/00245, como ejemplo).

El anticuerpo de HER2 puede ser uno que "no inhibe la escisión del ectodominio de HER2" (Molina *et al.* Cancer Res. 61: 4744-4749(2001)).

Un anticuerpo de HER2 que "se une con un sitio de unión heterodimérico" de HER2, se une con restos en el dominio II (y opcionalmente también se une con restos en otro de los dominios del dominio extracelular de HER2, tales como los dominios I y III) y puede impedir de forma estérica, al menos en algún grado, la formación de un heterodímero de HER2-EGFR, HER2-HER3 o HER2-HER4. Franklin *et al.* Cancer Cell 5: 317-328 (2004) caracteriza la estructura cristalina de HER2-Pertuzumab, depositada en el Banco de Datos de Proteínas RCSB (ID Código IS78), que ilustra un anticuerpo ejemplar que se une con el sitio de unión heterodimérico de HER2.

Un anticuerpo que "se une con el dominio II" de HER2 se une con restos en el dominio II y opcionalmente restos en otro u otros dominios de HER2, tales como los dominios I y III. Preferentemente, el anticuerpo que se une con el dominio II se une con el punto de unión entre los dominios I, II y III de HER2.

Un "agente inhibidor del crecimiento" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa HER *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor de crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan HER en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y la detención en fase M. Los bloqueantes de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se extienden hasta detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como un tamoxifeno, prednisona, dacarbacina, 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), especialmente pág. 13.

Son ejemplos de anticuerpos "inhibidores del crecimiento" los que se unen con HER2 e inhiben el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan HER2. Los anticuerpos de HER2 inhibidores del crecimiento preferentes inhiben el crecimiento de células tumorales de mama SK-BR-3 en cultivo celular en más del 20 %, y preferentemente en más del 50 % (por ejemplo de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 %) a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 $\mu\text{g/ml}$, en el que la inhibición del crecimiento se determina seis días después de la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase, Patente de Estados Unidos N° 5.677.171 presentada el 14 de octubre de 1987). El ensayo de inhibición del crecimiento de células SK-BR-3 se describe en más detalle en esa patente y posteriormente en el presente documento. El anticuerpo inhibidor del crecimiento preferente es una variante humanizada del anticuerpo monoclonal murino 4D5, por ejemplo, Trastuzumab.

Un anticuerpo que "induce apoptosis" es uno que induce la muerte celular programada como se determina por la unión de anexina V, fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (llamados cuerpos apoptóticos). La célula es habitualmente una que sobreexpresa el receptor HER2. Preferentemente la célula es una célula tumoral, por ejemplo una célula de mama, ovárica, de estómago, endometrial, de glándula salival, de pulmón, de riñón, de colon, de tiroides, pancreática o de vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, célula 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, la translocación de fosfatidil serina (PS) puede medirse por unión de anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse mediante comparación con marcadores de ADN; y la condensación nuclear/de cromatina junto con fragmentación a lo largo del ADN puede evaluarse por cualquier aumento en células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es uno que da como resultado aproximadamente 2 a 50 veces, preferentemente de aproximadamente 5 a 50 veces, y más preferentemente de aproximadamente 10 a 50 veces, inducción de unión de anexina en relación con la célula no tratada en un ensayo

de unión de anexina usando células BT474 (véase posteriormente). Los ejemplos de anticuerpos de HER2 que inducen la apoptosis son 7C2 y 7F3.

El "epítipo 2C4" es la región del dominio extracelular de HER2 con la que se une el anticuerpo 2C4. Para explorar con respecto a anticuerpos que se unen con el epítipo 2C2, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse mapeo de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une con el epítipo 2C4 de HER2 usando métodos conocidos en la técnica y/o se puede estudiar la estructura de anticuerpo-HER2 (Franklin *et al.* *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004)) para ver qué dominio o dominios de HER2 se unen con el anticuerpo. El epítipo 2C4 comprende restos del dominio II en el dominio extracelular de HER2. 2C4 y Pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en el punto de unión de los dominios I, II y III. Franklin *et al.* *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004).

El "epítipo 4D5" es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y Trastuzumab. Este epítipo está cerca del dominio transmembrana de HER2, y dentro del Dominio IV de HER2. Para explorar con respecto a anticuerpos que se unen con el epítipo 4D5, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse mapeo de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une con el epítipo 4D5 de HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más restos en la región de aproximadamente el resto 529 a aproximadamente el resto 625, inclusive, en la Fig. 1).

El "epítipo 7C2/7F3" es la región en el extremo N terminal, dentro del Dominio I, del dominio extracelular de HER2 con el que se unen los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (cada uno depositado en la ATCC, véase posteriormente). Para explorar con respecto a anticuerpos que se unen con el epítipo 7C2/7F3, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse mapeo de epítipos para establecer si el anticuerpo se une con el epítipo 7C2/7F3 en el HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más de los restos en la región de aproximadamente el resto 22 a aproximadamente el resto 53 de HER2 en la Fig. 1).

El "tratamiento" se refiere a tanto tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que necesiten tratamiento incluyen los que ya tienen la enfermedad así como en los que va a prevenirse la enfermedad. Por lo tanto, el paciente a tratar en el presente documento puede haberse diagnosticado que tiene la enfermedad o puede estar predispuesto o ser susceptible a la enfermedad.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma "incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma y cáncer de células de islotes), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer del hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peneano, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar la enfermedad en el paciente. Cuando la enfermedad es cáncer, la cantidad eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño tumoral; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en algún grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en algún grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad eficaz puede extender la supervivencia sin progresión, dar como resultado una respuesta objetiva (incluyendo una respuesta parcial, PR, o respuesta completa, CR), aumentar el tiempo de supervivencia total y/o mejorar uno o más síntomas de cáncer.

Un "cáncer que expresa HER2" es uno que comprende células que tienen la proteína HER2 presente en su superficie celular.

Un cáncer que "sobrexprende" un receptor HER es uno que tiene niveles significativamente mayores de un receptor HER, tal como HER2, en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular. Dicha sobreexpresión puede estar provocada por la amplificación génica o por transcripción o traducción

5 aumentadas. La sobreexpresión del receptor HER puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles aumentados de la proteína HER presente en la superficie de una célula (por ejemplo mediante un ensayo inmunohistoquímico; IHC). Como alternativa, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica HER en la célula, por ejemplo mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH; véase documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia de Southern o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tales como PCR cuantitativa tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión de receptor HER midiendo el antígeno desprendido (por ejemplo, dominio extracelular de HER) en un fluido biológico tal como suero (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.933.294 presentada el 12 de junio de 1990; documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991; Patente de Estados Unidos 5.401.638 presentada el 28 de marzo de 1995; y Sias *et al.* J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, están disponibles para los expertos en la materia diversos ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está marcado opcionalmente con un marcador detectable, por ejemplo un isótopo radioactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo con células en el paciente, por ejemplo mediante exploración externa por radioactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Por el contrario, un cáncer que “no sobreexpresa el receptor HER2” es uno que no expresa niveles mayores de lo normal de receptor de HER2 en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular.

20 Un cáncer que “sobreexpresa” un ligando de HER es uno que produce niveles significativamente mayores de ese ligando en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular. Dicha sobreexpresión puede estar provocada por amplificación génica o por transcripción o traducción aumentada. La sobreexpresión del ligando de HER puede determinarse de forma diagnóstica evaluando los niveles del ligando (o ácido nucleico que lo codifica) en el paciente, por ejemplo en una biopsia pulmonar o por diversos ensayos de diagnóstico tales como los ensayos IHC, FISH, transferencia de Southern, PCR o *in vivo* descritos anteriormente.

La expresión “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CITOXAN®); alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiestatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma11 y caicheamicina omega11 (véase, por ejemplo., Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos y antibióticos cromóforos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposoma de doxorrubicina HCl (DOXIL®), doxorrubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET®), doxorrubicina liposómica pegilada (CAELYX®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como deopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, enocitabina, floxuridina; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaciquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinán; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol;

5 nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos
 PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico;
 triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina);
 10 uretano; dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa;
 taxoide, por ejemplo, *paclitaxel* (TAXOL®), formulación de nanopartículas obtenidas por ingeniería de albúminas de
 paclitaxel (ABRAXANE™) y docetaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato;
 agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vincas, que evitan que la polimerización de
 tubulina forme microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®,
 FILDESIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona;
 15 edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina
 (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, incluyendo bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como
 clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido
 zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®),
 o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos
 20 antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la
 proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y el receptor del factor de crecimiento
 epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna
 ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo,
 LURTOTECAN®); rnrh (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosina,
 25 inhibidor de COX-2 (por ejemplo celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosoma (por ejemplo PS341); bortezomib
 (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersen sódico
 (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase definición posterior); inhibidores de tirosina quinasa
 (véase definición posterior); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los
 anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una
 30 terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura de un
 régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal
 en tumores tales como anti-estrógenos con mezcla de perfil agonista/antagonista, incluyendo, tamoxifeno
 35 (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®),
 trioxifeno, keoxifeno, y modulares del receptor de estrógeno selectivos (SERM) tales como SERM3; anti-estrógenos
 puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®) y EM800 (dichos agentes pueden bloquear
 la dimerización del receptor de estrógenos (ER), inhibir la unión de ADN, aumentar la renovación de ER y/o suprimir
 los niveles de ER); inhibidores de aromatatasas, incluyendo inhibidores de aromatasa esteroideos tales como
 40 formestano y exemestano (AROMASIN®), e inhibidores de aromatasa no esteroideos tales como anastrozol
 (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de aromatasa incluyendo vorozol
 (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol, imidazol; agonistas de la hormona liberadora de hormona
 lutenizante, incluyendo leuprolide (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, busserelina y tripterelina; esteroides
 sexuales, incluyendo progestinas tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos
 45 tales como dietilestilbestrol y premarina, y andrógenos/retinoides tales fluoximesterona, ácido trans-retinóico y
 fenretinida; onapristona; anti-progesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); anti-
 andrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; testolactona; y sales, ácidos o derivados
 farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los
 anteriores.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fármaco dirigido a EGFR" se refiere a un agente terapéutico
 que se une con EGFR y, opcionalmente inhibe la activación de EGFR. Los ejemplos de dichos agentes incluyen
 anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen con EGFR
 50 incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528
 (ATCC CRL 8509) (véase, Patente de Estados Unidos N° 4.943.533, Mendelsohn *et al.*) y variantes de los mismos,
 tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano remodelado (H225) (véase, documento
 WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo dirigido a EGFR completamente humano (Imclone);
 anticuerpos que se unen con EGFR mutante de tipo II (Patente de Estados Unidos N° 5.212.290); anticuerpos
 55 humanizados o quiméricos que se unen con EGFR como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.891.996;
 y anticuerpos humanos que se unen con EGFR, tales como ABX-EGF o Panitumumab (véase documento
 WO98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto *et al.* Eur. J. Cancer 32A: 636-640 (1996)); EMD7200
 (matuzumab) un anticuerpo de EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite tanto con EGF como con
 TGF-alfa por la unión con EGFR (EMD/Merck); anticuerpo de EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticuerpos
 completamente humanos conocidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 y E7.6.3 y descritos en el
 60 documento US 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc); y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns *et al.*, J. Biol. Chem.
 279(29): 30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico, generando de
 este modo un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, documento EP659.439A2, Patente de Merck GmbH). Los
 antagonistas de EGFR incluyen moléculas pequeñas tales como compuestos descritos en las Patentes de Estados
 Unidos N°: 5.616.582, 5.457.105, 5.475.001, 5.654.307, 5.679.683, 6.084.095, 6.265.410, 6.455.534, 6.521.620,

6.596.726, 6.713.484, 5.770.599, 6.140.332, 5.866.572, 6.399.602, 6.344.459, 6.602.863, 6.391.874, 6.344.455, 5.760.041, 6.002.008 y 5.747.498, así como las siguientes publicaciones de PCT: WO98/14451, WO98/50038, WO99/09016 y WO99/24037. Las moléculas pequeñas antagonistas de EGFR particulares incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, *N*-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-, diclorhidrato, Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA™) 4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolina, Astra-Zeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (*N*8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-*N*2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-*d*]pirimidin-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((*R*)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1-*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-6-il]-fenol); (*R*)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletil)amino]-7-*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina); CL-387785 (*N*-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butanamida); EKB-569 (*N*-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butanamida) (Wiet); AG1478 (Sugen); AG1571 (SU 5271; Sugen); inhibidores de tirosina quinasa EGFR/HER2 dobles tales como lapatinib (GW 572016 o *N*-[3-cloro-4-(3-fluorofenil)metoxi]fenil]6[5[[[2metilsulfonil]etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina; Glaxo-SmitKline) o derivados de cianoguanidín quinazolina y cianoamidín quinazolamina.

Un "inhibidor de tirosina quinasa" es una molécula que inhibe la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa tal como un receptor HER. Los ejemplos de dichos inhibidores incluyen los fármacos dirigidos a EGFR observados en el párrafo anterior; molécula pequeña inhibidora de tirosina quinasa HER2 tal como TAK165 disponible de Takeda; CP-724,714, un inhibidor selectivo oral del receptor tirosina quinasa ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores de HER dobles tales como EKB-569 (disponible de Wyeth) que se une preferentemente con EGFR pero inhibe células que sobreexpresan tanto HER2 como EGFR; lapatinib (GW572016; disponible de Glaxo-SmithKline) un inhibidor de tirosina quinasa HER2 y EGFR oral; PKI-166 (disponible de Novartis); inhibidores pan-HER tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1 tales como agente antisentido ISIS-5132 disponible de ISIS Pharmaceuticals que inhibe la señalización de Raf-1; inhibidores de TK no dirigidos a HER tales como Imatinib mesilato (GLEEVEC™) disponibles de Glaxo; inhibidor de quinasa I regulada extracelular MAPK CI-1040 (disponible de Pharmacia); quinazolininas, tales como PD 153035,4-(3-cloroanilino) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7-*H*-pirrolo[2,3-*d*] pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen restos de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por ejemplo las que se unen con ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (Patente de Estados Unidos Nº 5.804.396); trifostinas (Patente de Estados Unidos Nº 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-HER tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); Imatinib mesilato (Gleevec; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); derivados de cianoguanidín quinazolina y cianoamidín quinazolamina; o como se ha descrito en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: Patente de Estados Unidos Nº 5.804.396; documentos WO99/09016 (American Cyanamid); WO98/43960 (American Cyanamid); WO97/38983 (Warner Lambert); WO99/06378 (Warner Lambert); WO99/06396 (Warner Lambert); WO96/30347 (Pfizer, Inc); WO96/33978 (Zeneca); WO96/3397 (Zeneca); WO96/33980 (Zeneca); y US2005/0101617.

Un "agente anti-angiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado con el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico puede, por ejemplo, ser una molécula pequeña o anticuerpo que se une con un factor de crecimiento o receptor de factor de crecimiento implicado en la promoción de angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferente en el presente documento es un anticuerpo que se une al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), tal como Bevacizumab (AVASTIN®).

El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Son ejemplos de dichas citocinas linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citocinas la hormona del crecimiento tales como hormona de crecimiento humana, hormona del crecimiento humana *N*-metionilo, y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tirosina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glucoprotéicas tales como hormona estimulante del foliculo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona leutinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina, lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral- α y β ; sustancia inhibidora muleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina, activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento de tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón- α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

II. Composiciones de variantes de anticuerpo de HER2

La presente invención se refiere a la composición de anticuerpos de HER2 como se define en las reivindicaciones.

5 La presencia de la extensión de líder amino-terminal en la composición puede detectarse por diversas técnicas analíticas incluyendo, pero sin limitación, análisis de secuencia N-terminal, ensayo con respecto a heterogeneidad de carga (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis de zona capilar), espectrometría de masas, etc. La cantidad de la anticuerpo variante en la composición varía generalmente de una cantidad que constituye el límite de detección inferior de cualquier ensayo (preferentemente análisis de intercambio catiónico) usado para detectar la variante en una cantidad menor que la cantidad del anticuerpo de especie principal.

Del 5 % a aproximadamente el 15 %, y preferentemente de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 12 % de las moléculas de anticuerpo en la composición comprenden una extensión de líder amino-terminal. Dichas cantidades porcentuales se determinan preferentemente usando análisis de intercambio catiónico.

15 Aparte de la variante de extensión de líder amino-terminal, se contemplan más alteraciones de secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la especie principal y/o variante, incluyendo pero sin limitación un anticuerpo que comprende un resto de lisina C-terminal en una o ambas cadenas pesadas del mismo (dicha variante de anticuerpo puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 20 %), una variante de anticuerpo desamidada (por ejemplo, en la que Asn-386 y/o Asn-391 en una o dos cadenas pesadas de Pertuzumab están desamidadas), anticuerpo con uno o más restos de metionina oxidados (por ejemplo, Pertuzumab que comprende met-254 oxidado), etc.

25 Además, la especie principal del anticuerpo puede comprender adicionalmente variaciones de glucosilación, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen anticuerpo que comprende una estructura de oligosacárido G1 o G2 unida con la región Fc del mismo, el anticuerpo que comprende un resto de carbohidrato unido con una cadena ligera del mismo (por ejemplo, uno o dos restos de carbohidratos, tales como glucosa o galactosa, unidos a una o dos cadenas ligeras del anticuerpo, por ejemplo unidos a uno o más restos de lisina), el anticuerpo que comprende una o dos cadenas pesadas no glucosiladas, o anticuerpo que comprende un oligosacárido sialidado unido a una o dos cadenas pesadas del mismo, etc.

30 Además, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una o dos cadenas ligeras, en el que una o ambas de las cadenas ligeras comprenden la secuencia de aminoácidos en SEC ID N°: 23. Este anticuerpo comprende además de una o dos cadenas pesadas, en las que una o ambas de las cadenas pesadas comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 16 o SEC ID N°: 24 (o variantes desamidadas y/u oxidadas de las mismas).

35 La composición puede recuperarse de una línea celular modificada por ingeniería genética, por ejemplo, una línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que expresa el anticuerpo de HER2 o puede prepararse por síntesis peptídica.

40

III. Producción de anticuerpos de HER2

45 A continuación hay una descripción con respecto a técnicas ejemplares para la producción de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención. El antígeno de **HER2** a usar para producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de **HER2** o una parte del mismo, que contiene el epítipo deseado. Como alternativa, pueden usarse células que expresan HER2 en su superficie celular (por ejemplo células NIH-3T3 transformadas para sobreexpresar HER2; 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 HER2 útiles para generar anticuerpos resultarán evidentes para los expertos en la materia.

50 (i) *Anticuerpos policlonales*

55 Se inducen preferentemente anticuerpos policlonales en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intra peritoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de semilla de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzil sulfosuccinimida (conjugación mediante restos de cisteína), *N*-hidroxisuccinimida (mediante restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínimico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en la que R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

60 Se inmunizan animales contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días después se toman muestras se desangran los animales y el suero se ensaya con respecto a título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que el título alcanza una

65

meseta. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también pueden prepararse en cultivo celular recombinante como fusiones proteicas. Además, se usan convenientemente agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmune.

5

(ii) *Anticuerpos monoclonales*

Se obtienen anticuerpos monoclonales a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, tales como las variantes descritas en el presente documento. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos.

10

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

15

En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, como se ha descrito anteriormente en el presente documento para activar a los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después se fusionan linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas. 59-103 (Academic Press, 1986)).

20

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

25

30

Son células de mieloma preferentes las que se fusionan eficazmente, apoyan la producción estable de altos niveles del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como un medio HAT. Entre éstas, son líneas celulares de mieloma preferentes las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Centro de Distribución Celular del Instituto Salk, San Diego, California, Estados Unidos y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland, Estados Unidos. También se han descrito líneas celulares de heteromieloma de ratón-ser humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); y Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

35

40

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

45

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución límite y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas. 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 líquido ascítico en un animal.

55

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan convenientemente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencía usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma actúan como una fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfieren en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de

65

revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opin. in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) y Plückerthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

5 En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpo generadas usando las técnicas 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, usando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por barajado de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como
10 una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para aislamiento de anticuerpos monoclonales.

15 El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), o uniendo covalentemente con la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina.

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

25 (iii) Anticuerpos humanizados

Se han descrito en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de región hiper variables por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente
30 menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

40 La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método DEL "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como la región de marco conservado humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método usa una región de marco conservado particular derivada de las secuencias consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco conservado puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).
50

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con conservación de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferente, se preparan anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Están disponibles habitualmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y los expertos en la materia están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de modo que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de región hipervariable están implicados directamente y más sustancialmente en la influencia sobre la unión a antígeno.
60

65 El documento WO01/00245 describe la producción de anticuerpos de HER2 humanizados ejemplares que se unen con HER2 y bloquean la activación del ligando de un receptor HER. El anticuerpo humanizado de interés particular

en el presente documento bloquea la activación mediada por EGF, TGF- α y/o HRG de MAPK esencialmente tan eficazmente como el anticuerpo monoclonal murino intacto 2C4 (o un fragmento Fab del mismo) y/o se une con HER2 esencialmente tan eficazmente como el anticuerpo monoclonal murino intacto 2C4 (o un fragmento Fab del mismo). El anticuerpo humanizado en el presente documento puede comprender, por ejemplo, restos de región híper variable no humana incorporados en un dominio pesado variable humano y pueden comprender además una sustitución de región de marco conservado (FR) en una posición seleccionada del grupo que consiste en 69H, 71H y 73H utilizando el sistema de numeración de dominio variable expuesto en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de FR en dos o todas las posiciones 69H, 71H y 73H.

Un anticuerpo humanizado ejemplar de interés en el presente documento comprende restos determinantes de complementariedad pesados variables GFTFTDYTMX, en los que X es preferentemente D o S (SEC ID N^o: 7); DVNPNSSGGSIYNQRFKG (SEC ID N^o: 8); y/o NLGPSFYFDY (SEC ID N^o: 9), que comprende opcionalmente modificaciones de aminoácidos de esos restos de CDR, por ejemplo en los que las modificaciones esencialmente mantienen o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o de aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR pesadas variables anteriores. Dichas variantes de anticuerpo pueden prepararse por maduración de afinidad, por ejemplo, como se describe posteriormente. El anticuerpo humanizado más preferente comprende la secuencia de aminoácidos pesada variable en SEC ID N^o: 4.

El anticuerpo humanizado puede comprender restos determinantes de complementariedad ligeros variables KASQDVSIQVA (SEC ID N^o: 10); SASYX¹X²X³, en la que X¹ es preferentemente en R o L, X² es preferentemente Y o E, y X³ es preferentemente T o S (SEC ID N^o: 11); y/o QQYYIYPYT (SEC ID N^o: 12), por ejemplo además de los restos de CDR de dominio variable pesado en el párrafo anterior. Dichos anticuerpos humanizados comprenden opcionalmente modificaciones de aminoácidos de los restos CDR anteriores, por ejemplo en los que las modificaciones se mantienen esencialmente o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante el anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR ligeras variables anteriores. Dichas variantes de anticuerpo pueden prepararse por maduración de afinidad, por ejemplo, como se describe posteriormente. El anticuerpo humanizado más preferente comprende la secuencia de aminoácidos variable ligera en SEC ID N^o: 3.

La presente solicitud también contempla anticuerpos madurados por afinidad que se unen con **HER2** y bloquea la activación del ligando de un receptor HER. El anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, por ejemplo, uno que comprende las secuencias ligera variable y/o pesada variable de SEC ID N^o: 3 y 4, respectivamente (es decir variante 574). El anticuerpo madurado para afinidad preferentemente se une con el receptor HER2 con una afinidad superior a la del 2C4 murino intacto o 574 variante intacto (por ejemplo afinidad mejorada de aproximadamente dos o aproximadamente cuatro veces a aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1000 veces, por ejemplo como se evalúa usando un ELISA de dominio extracelular de HER2 (ECD)). Los restos de CDR variables pesadas ejemplares para sustitución incluyen H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99 o combinaciones de dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de estos restos). Los ejemplos de restos de CDR variables ligeras para alteración incluyen L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 o combinaciones de dos o más (por ejemplo de dos a tres, cuatro, cinco o hasta aproximadamente 10 de estos restos).

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está opcionalmente conjugado con uno o más agente(s) citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Como alternativa, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

(iv) Anticuerpos humanos

Como una alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, es posible ahora producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará 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); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno., 7: 33 (1993); y Patentes de Estados Unidos Nos 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

Como alternativa, puede usarse tecnología de presentación de fagos (McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, de repertorios de genes de dominio variable

de inmunoglobulina (V) de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en el marco de un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en 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 esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación de fagos puede realizarse en diversos formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para presentación de fagos. Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) aislaron una serie de diversos anticuerpos anti-oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes no inmunizados humanos y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo auto antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en 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 Estados Unidos N° 5.565.332 y 5.573.905.

También pueden generarse anticuerpos humanos por linfocitos B activados *in vitro* (véase Patentes de Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

Se describen anticuerpos de HER2 humanos en la Patente de Estados Unidos N° 5.772.997 presentada el 30 de junio de 1998 y el documento WO 97/00271 publicado el 3 de enero de 1997.

(v) *Fragmentos de anticuerpo*

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante 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 pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpo analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')₂ directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos resultarán evidentes para los expertos en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase documento WO 93/16185; Patente de Estados Unidos N° 5.571.894; y Patente de Estados Unidos N° 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser mono-específicos o bis-específicos.

(vi) *Anticuerpos bis-específicos*

Los anticuerpos bis-específicos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos bis-específicos ejemplares pueden unirse con dos epítopos diferentes de la proteína de HER2. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a HER2 con un sitio o sitios de unión para EGFR, HER3 y/o HER4. Como alternativa, puede combinarse una rama de HER2 con una rama que se une con una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula de receptor de linfocitos T (por ejemplo CD2 o CD3) o receptores para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular a la célula que expresa HER2. También pueden usarse anticuerpos bis-específicos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan HER2. Estos anticuerpos poseen una rama de unión a HER2 y una rama que se une con el agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo). Pueden prepararse anticuerpos bis-específicos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos bis-específicos F(ab')₂).

El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo bis-específico de HER2/FcγRIII y la Patente de Estados Unidos N° 5.837.234 desvela un anticuerpo bis-específico de HER2/FcγRI IDM1 (Osidem). Se muestra un anticuerpo bis-específico de HER2/Fcα en el documento WO98/02463. La Patente de Estados Unidos N° 5.821.337 enseña un anticuerpo bis-específico de HER2/CD3. MDX-210 es un Ab bis-específico de HER2-FcγRIII.

Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos bis-específicos. La producción tradicional de anticuerpos bis-específicos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solamente una tiene la estructura bis-específica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza por etapas de cromatografía de afinidad, es algo engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Se desvelan

procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para unión de cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y co-transfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no son particularmente importantes.

En una realización preferente de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente la mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.731.168, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivo celular recombinante. La interfase preferente comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplazan una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales mayores (por ejemplo tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o las cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con más pequeñas (por ejemplo, alanina o trionina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina, el otro con biotina. Se ha propuesto, por ejemplo, que dichos anticuerpos para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de reticulación conveniente. Se conocen bien en la técnica agentes de reticulación adecuados y se desvelan en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

También se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo en la biografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejos con ditiol arsenita sódica para estabilizar ditiolos vecinos y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados del Fab'-TNB se reconvierte después en Fab'-tiol por 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 usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizada F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse con células que sobreexpresaban el receptor de HER2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol, 148(5): 1547-1553 (1992). Se ligaron los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun con las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los

homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, se obliga a los dominios V_H y V_L de un fragmento a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha presentado otra estrategia para realizar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv (sFv) monocatenarios. Véase Gruber *et al.*, J. Immunol., 152: 5368 (1994).

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

(vii) *Otras modificaciones secuencia de aminoácidos.* Se contemplan la modificación o modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de HER2 descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo de HER2 introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico de anticuerpo de HER2 o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo de HER2. Se realiza cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para conseguir la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos puedan alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo HER2, tales como cambiar el número o posición de sitios de glucosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo de HER2 que son localizaciones preferentes para mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Cunningham y Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). En éste se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o de carga negativa (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con antígeno HER2. Las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza exploración de alanina o mutagénesis aleatoria en el codon o región diana y se exploran las variantes de anticuerpo de HER2 expresadas con respecto a la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo-terminales que varían de longitud de un resto a polipéptidos que contienen 100 o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo de HER2 con un resto metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo de HER2 incluyen la fusión con el extremo N o C-terminal del anticuerpo de HER2 con una enzima (por ejemplo para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo de HER2 reemplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hiper variables o CDR, pero también se contemplan alteraciones de FR o región Fc. Se muestran constituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferentes". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe además posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y explorarse los productos.

Tabla 1

Resto Original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
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)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr/Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucinae	Leu

Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica 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) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., páginas 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H)

Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basándose en sus propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de uno de estas clases por otra clase.

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo de HER2 también puede sustituirse, en general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el reticulado aberrante. Por el contrario, pueden añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferente de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental del que se generaron. Un modo conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración de afinidad usando presentación de fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de región híper variable (por ejemplo 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se presentan de una manera monovalente de partículas de fago filamentosas como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se exploran después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar sitios de la región hipervariable candidatos para modificación, puede realizarse mutagénesis de exploración de alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión con antígenos. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y HER2 humano. Dichos restos de contacto y restos cercanos son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se han generado dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se ha descrito en el presente documento y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo posterior.

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por

alterar se entiende suprimir uno o más restos de carbohidrato hallados en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de anticuerpos está normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares *N*-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse cualquier estructura de oligosacárido unida al mismo. Por ejemplo, se describen anticuerpos con una estructura de carbohidratos madura que carecen de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo en la solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2003/0157108 A1, Presta, L. Véase también documento US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se hace referencia a anticuerpos con una *N*-acetilglucosamina (GlcNAC) en la bisectriz de la estructura de oligosacáridos unida a una región Fc del anticuerpo en el documento WO03/011878, Jean-Mairet *et al.* y Patente de Estados Unidos N° 6.602.684, Umana *et al.* Se presentan anticuerpos con al menos un resto de galactosa en una estructura de oligosacárido unida con una región Fc del anticuerpo en el documento WO97/30087, Patel *et al.* Véase, también, documentos WO98/58964 (Raju, S.) y WO99/22764 (Raju, S.) con respecto a anticuerpos con carbohidratos alterados unidos con la región Fc de los mismos. Se contemplan en el presente documento composiciones de anticuerpo que comprenden la especie principal del anticuerpo con dichas estructuras de carbohidratos unidas a una o dos cadenas pesadas de la región Fc.

Se prepara moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo del HER2 por diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casetes de una variante preparada antes o una versión no variante del anticuerpo de HER2.

(viii) Exploración con respecto a anticuerpos con las propiedades deseadas

Se han descrito anteriormente técnicas para generar anticuerpos. Se pueden seleccionar adicionalmente anticuerpos con ciertas características biológicas, según se desee.

Para identificar un anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER, puede determinarse la capacidad del anticuerpo para bloquear la unión del ligando de HER con células que expresan el receptor HER (por ejemplo conjugación con otro receptor HER con el que el receptor HER de interés forma un hetero-oligómero de HER). Por ejemplo, pueden incubarse células que expresan de forma natural o se transfectan para expresar, receptores HER del hetero-oligómero de HER con el anticuerpo y después exponerse al ligando de HER marcado. La capacidad del anticuerpo de HER2 para bloquear la unión del ligando con el receptor HER en el hetero-oligómero de HER puede evaluarse después.

Por ejemplo, puede realizarse inhibición de la unión de HRG con líneas celulares de tumor de mama MCF7 por anticuerpos de HER2 usando cultivos de MCF7 en monocapa en hielo en un formato de placa de 24 pocillos esencialmente como se ha descrito en el documento WO01/00245. Pueden añadirse entonces anticuerpos monoclonales de HER2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos. Puede añadirse entonces rHRG $\beta_{1177-224}$ marcado con ^{125}I (25 pm), y la incubación puede continuarse durante 4 a 16 horas. Pueden prepararse curvas de respuesta a dosis y puede calcularse un valor de CI_{50} para el anticuerpo de interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá un CI_{50} para inhibir la unión de HRG con células MCF7 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la CI_{50} para inhibir la unión de HRG con células MCF7 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menos, más preferentemente 50 nM o menos.

Como alternativa, o adicionalmente, la capacidad del anticuerpo de HER2 para bloquear la fosforilación de tirosina estimulada por ligando de HER de un receptor HER presente en un hetero-oligómero de HER puede evaluarse. Por ejemplo, pueden incubarse células que expresan de forma endógena los receptores HER o transfectadas para expresarlos con el anticuerpo y después ensayarse con respecto a actividad de fosforilación de tirosina dependiente de ligando de HER usando un anticuerpo monoclonal antifosfotirosina (que está conjugado

opcionalmente con un marcador detectable). El ensayo de activación del receptor quinasa descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.766.863 también está disponible para determinar la activación del receptor HER y el bloqueo de esa actividad por un anticuerpo.

5 Se puede explorar con respecto a un anticuerpo que inhiba la estimulación de HRG de fosforilación de tirosina en p180 en células MC7 esencialmente como se describe en el documento WO01/00245. Por ejemplo, las células MCF7 pueden sembrarse en placas de 24 pocillos y pueden añadirse anticuerpos monoclonales a HER2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente; después puede añadirse rHRG $\beta_{177-244}$ a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM, y la incubación puede continuarse durante 8 minutos. Los medios pueden aspirarse de cada pocillo, y las reacciones pueden detenerse mediante la adición de 100 μ l de tampón de muestra de SDS (SDS 5 %, DTT 25 mM; y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25 μ l) puede someterse a electroforesis en un gel de gradiente de 4-12 % (Novex) y después transferirse electroforéticamente a membrana de difluoruro de polivinilideno. Pueden revelarse inmunotransferencias antifosfotirosina (a 1 μ g/ml), y puede cuantificarse la intensidad de la banda reactiva predominante a $M_r \sim 180.000$ mediante densitometría de reflectancia. El anticuerpo seleccionado inhibirá preferentemente de forma significativa la estimulación de HRG de fosforilación de tirosina en p180 a aproximadamente 0-35 % de control en este ensayo. Puede prepararse una curva de respuesta a dosis para la inhibición de estimulación de HRG de fosforilación de tirosina de p180 como se determina por densitometría de reflectancia y puede calcularse una CI_{50} para el anticuerpo de interés. Finalmente, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá una CI_{50} para inhibir la estimulación de HRG de fosforilación de tirosina en p180 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la CI_{50} para inhibir la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina en p180 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menos, más preferentemente 50 nM o menos.

25 También se puede evaluar los efectos inhibidores en el crecimiento del anticuerpo en células MDA-MB-175, por ejemplo, esencialmente como se describe en Schaefer *et al.* Oncogene 15: 1385-1394 (1997). De acuerdo con este ensayo, las células MDA-MB-175 pueden tratarse con un anticuerpo monoclonal de HER2 (10 μ g/ml) durante 4 días y teñirse con cristal violeta. La incubación con un anticuerpo de HER2 puede mostrar un efecto inhibidor de crecimiento en esta línea celular similar al presentado por el anticuerpo monoclonal 2C4. La HRG exógena puede no invertir significativamente esta inhibición. Preferentemente, el anticuerpo será capaz de inhibir la proliferación celular de células MDA-MB-175 en un mayor grado que el anticuerpo monoclonal 4D5 (y opcionalmente en un mayor grado que el anticuerpo monoclonal 7F3), tanto en presencia como en ausencia de HRG exógena.

35 El anticuerpo de HER2 de interés puede bloquear la asociación dependiente de herregulina de HER2 con HER3 tanto en células MCF7 como SK-BR-3 como se determina en un experimento de co-inmunoprecipitación tal como el descrito en el documento WO01/00245 de forma sustancialmente más eficaz que el anticuerpo monoclonal 4D5, y preferentemente de forma sustancialmente más eficaz que el anticuerpo monoclonal 7F3.

40 Para identificar anticuerpos de HER2 inhibidores del crecimiento, se puede explorar con respecto a anticuerpos que inhiben el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan HER2. Opcionalmente, el anticuerpo inhibidor del crecimiento elegido es capaz de inhibir el crecimiento de células SK-BR-3 en cultivo celular en aproximadamente el 20-100 % y preferentemente en aproximadamente 50-100 % a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 μ g/ml. Para identificar dichos anticuerpos, puede realizarse el ensayo de SK-BR-3 descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.677.171. De acuerdo con este ensayo, las células SK-BR-3 se cultivan en una mezcla 1:1 de F12 y medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina y penicilina estreptomocina. Las células SK-BR-3 se siembran 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 30 μ g/ml del anticuerpo de HER2 por placa. Después de seis días, se cuenta el número de células, en comparación con las células no tratadas, usando un contador celular electrónico COULTER™. Los anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SK-BR-3 en aproximadamente 20-100 % o aproximadamente 50-100 % pueden seleccionarse como anticuerpos inhibidores del crecimiento. Véase Patente de Estados Unidos N° 5.677.171 para ensayos para explorar con respecto a anticuerpos inhibidores del crecimiento, tales como 4D5 y 3E8.

55 Para seleccionar los anticuerpos que inducen la apoptosis, está disponible un ensayo de unión a anexina usando células BT474. Las células BT474 se cultivan y siembran en placas como se ha analizado en el párrafo anterior. El medio se retira después y se reemplaza con medio nuevo solo o medio que contiene 10 μ g/ml del anticuerpo monoclonal. Después de un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se separan por tripsinización. Las células se centrifugan después, se resuspenden en tampón de unión con Ca^{2+} y se separan en alícuotas en tubos como se ha analizado anteriormente para el ensayo de muerte celular. Los tubos reciben después anexina marcada (por ejemplo anexina V-FTIC) (1 μ g/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSAN™ y software de FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión de anexina en relación con el control se seleccionan como anticuerpos inductores de apoptosis. Además del ensayo de unión a anexina, está disponible un ensayo de tinción de ADN usando células BT474. Para realizar este ensayo, se incuban células BT474 que se han tratado con el anticuerpo de interés como se ha descrito en los dos párrafos anteriores con HOECHST 33342™ 9 μ g/ml durante 2

h a 37 °C, después se analizan en un citómetro de flujo EPICS ELITE™ (Coulter Corporation) usando software MODFIT LT™ (Verity Software House). Pueden seleccionarse anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas que es 2 veces o más (y preferentemente 3 o más) más alto que las células no tratadas (hasta 100 % de células apoptóticas) como anticuerpos pro-apoptóticos usando este ensayo. Véase el documento WO98/17797 para ensayos para explorar con respecto a anticuerpos que inducen apoptosis, tales como 7C2 y 7F3.

Para explorar con respecto a anticuerpos que se unen a un epítipo en HER2 unido con un anticuerpo de interés, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988), para evaluar si el anticuerpo bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo, tal como 2C4 o Pertuzumab, con HER2. Como alternativa, o adicionalmente, puede realizarse un mapeo de epítopos por métodos conocidos en la técnica y/o se puede estudiar la estructura de anticuerpo-HER2 (Franklin *et al.* *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004)) para ver qué dominio o dominios de HER2 se unen con el anticuerpo.

(ix) Inmunoconjugados

Los inmunoconjugados comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo una toxina de moléculas pequeñas o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados. También se contemplan en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una calicheamicina, una maitansina (Patente de Estados Unidos N° 5.208.020), un tricoteno, y CC1065.

Un anticuerpo puede conjugarse con una o más moléculas de maitansina (por ejemplo aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina puede, por ejemplo, convertirse a May-SS-Me que puede reducirse a May-SH3 y hacerse reaccionar con un anticuerpo modificado (Chari *et al.* *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)) para generar un inmunoconjugado de maitansinoide-anticuerpo.

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo de **HER2** conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos de la calicheamicina es capaz de producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Los análogos estructurales de calicheamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , *N*-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman *et al.* *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) y Lode *et al.* *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)). Véase, también, Patentes de Estados Unidos N° 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586; y 5.773.001.

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

Puede formarse un inmunoconjugado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Están disponibles diversos isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos de HER2 radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioactivos de Lu.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (*p*-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniumbenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina como se ha descrito en Vitetta *et al.* *Science* 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietil triaminopentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.* *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)).

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo de HER2 y un agente citotóxico, por ejemplo por técnicas recombinantes o síntesis peptídica.

Un anticuerpo puede conjugarse con una "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en la predirección tumoral en la que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra paciente, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente clarificador y después la administración de un "ligando" (por ejemplo avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido).

(x) Otras modificaciones de anticuerpos

Se contemplan en el presente documento otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede ligarse a uno de diversos polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede atraparse en microcápsulas preparadas como por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente), en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependientes de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, pueden introducirse un resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) mejoradas. Véase Caron *et al.*, J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). También puede prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando agentes de entrecruzamiento hetero-bifuncionales como se describe en Wolff *et al.* Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, puede obtenerse por ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones de Fc dobles y puede tener por lo tanto capacidades de lisis del complemento y ADCC potenciadas. Véase Stevenson *et al.* Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

El documento WO00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, en el que los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácidos en la región Fc del mismo. Preferentemente, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc. Preferentemente la región Fc alterada es una región Fc IgG1 que comprende o consiste en sustituciones en una, dos o tres de estas posiciones.

Se describen anticuerpos con unión HER2y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas en el documento WO99/51642, Patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1, Patente de Estados Unidos N° 6.242.195B1, Patente de Estados Unidos N° 6.528.624B1 y Patente de Estados Unidos N° 6.538.124 (Idusogie *et al.*). Los anticuerpos comprenden una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc de los mismos.

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor de recuperación en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión al receptor de recuperación" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula IgG. También se describen anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos y semividas en suero aumentadas en el documento WO00/42072 (Presta, L.).

También se contemplan anticuerpos modificados por ingeniería genética con tres o más (preferentemente cuatro) sitios de unión a antígeno funcionales (Solicitud de Estados Unidos N° US2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

Los anticuerpos de HER2 desvelados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Se preparan liposomas que contienen el anticuerpo por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545; y documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Se desvelan liposomas con tiempo de circulación potenciado en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556.

Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Se extruyen liposomas a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el

diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención con los liposomas como se describe en Martin *et al.* J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase, Gabizon *et al.* J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989).

IV. Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones terapéuticas de las composiciones de la presente invención mezclando la composición con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables que no son tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina, conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilo amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de 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 incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones 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). Se describen formulaciones de anticuerpos de **HER2** liofilizados en el documento WO 97/04801.

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente las que tienen actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además anticuerpos que se unen con EGFR, HER2 (por ejemplo un anticuerpo que se une con un epítipo diferente en HER2), HER3, HER4 o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en una formulación. Como alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal, fármaco dirigido a EGFR, agente anti-angiogénico, inhibidor de tirosina quinasa, y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes convenientemente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los principios activos también pueden estar inmovilizados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de suministros de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidas (Patente de Estados Unidos Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etilvinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de co-polímero de ácido láctico-ácido glucólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones para usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración mediante membranas de filtración estériles.

V. Exploración de pacientes para la terapia.

Un paciente seleccionado para terapia puede tener un tumor, u otra célula o tejido, que presenta activación de HER (y preferentemente HER2). El alcance de la activación de HER (o HER2) en células cancerosas u otras células ensayadas supera significativamente el nivel de activación de ese receptor en células no cancerosas o normales del mismo tipo tisular. Dicha activación excesiva puede resultar de la sobreexpresión del receptor HER y/o niveles mayores de lo normal de un ligando de HER disponible para activar al receptor HER en las células cancerosas. Dicha activación excesiva puede provocar y/o estar provocada por el estado maligno de una célula cancerosa. Opcionalmente el cáncer puede someterse a un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si se produce amplificación y/o sobreexpresión de un receptor HER que da como resultado dicha activación excesiva del receptor HER. Como alternativa, o adicionalmente, el cáncer puede someterse a un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si se produce amplificación y/o sobreexpresión de un ligando de HER en el cáncer que contribuye a activación excesiva del receptor. En un subconjunto de dichos cánceres, la activación excesiva del receptor puede resultar de una ruta estimuladora autocrina. Se describirán diversos ensayos ejemplares para determinar la

activación de HER en más detalle posteriormente.

(i) *Dímeros de HER*

5 Las muestras pueden evaluarse con respecto a la presencia de dímeros de HER, indicando la activación de HER o HER2. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para detectar dímeros de HER2, tales como EGFR-HER2, HER2-HER3. Se describen posteriormente varios métodos preferentes. Estos métodos detectan interacciones proteína-proteína no covalentes o indican de otro modo la proximidad entre proteínas de interés.

10 Se usan métodos basados en inmunofinidad, tales como inmunoprecipitación o ELISA, para detectar dímeros de HER. En una realización, se usan anticuerpos de HER2 para inmunoprecipitar complejos que comprenden HER2 de células tumorales, y el inmunoprecipitante resultante se explora después con respecto a la presencia de EGFR o HER3 por inmunotransferencia. En otra realización, pueden usarse anticuerpos de EGFR o HER3 para la etapa de inmunoprecipitación y explorarse después el inmunoprecipitante con anticuerpos de HER2. En una realización
15 adicional, pueden usarse ligandos de HER específicos de EGFR, HER3, complejos EGFR-HER2 o complejos HER2-HER3 para precipitar complejos, que después se exploran con respecto a la presencia de HER2. Por ejemplo, pueden conjugarse ligandos con avidina y purificarse complejos en una columna de biotina.

20 En otras realizaciones, tales como ELISA o ensayos de tipo “sándwich” de anticuerpos, se inmovilizan anticuerpos en HER2 en un soporte sólido, se ponen en contacto con células tumorales o lisados de células tumorales, se lavan, y después se exponen a un anticuerpo contra EGFR o HER3. La unión de este último anticuerpo, que puede detectarse directamente o por un anticuerpo secundario conjugado con un marcador detectable, indica la presencia de heterodímeros. En ciertas realizaciones, en anticuerpo de EGFR o HER3 se inmoviliza, y el anticuerpo de HER2 se usa para la etapa de detección. En otras realizaciones pueden usarse ligandos de HER en lugar de, o en
25 combinación con anticuerpos de HER.

También pueden usarse entrecruzamiento químico o por UV para unir covalentemente dímeros en la superficie de células vivas. Hunter *et al.*, *Biochem. J.*, 320: 847-53. Los ejemplos de agentes de entrecruzamiento químico
30 incluyen un ditiobis(succinimidil) propionato (DSP) y 3,3'ditiobis(sulfosuccinimidil) propionato (DTSSP). En una realización, se analizan extractos celulares de células tumorales con entrecruzamiento químico por SDS-PAGE y se someten a inmunotransferencia con anticuerpos para EGFR y/o HER3. Una banda súper desplazada de peso molecular apropiado representa más probablemente dímeros EGFR-HER2 o HER2-HER3, ya que el **HER2** es el compañero de dimerización preferente para EGFR y HER3. Este resultado puede confirmarse por inmunotransferencia posterior con anticuerpos de **HER2**.

35 También puede usarse transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para detectar dímeros de EGFR-HER2 o HER2-HER3. FRET detecta cambios conformacionales de proteínas e interacciones proteína-proteína *in vivo* e *in vitro* basándose en la transferencia de energía de un fluoróforo donante a un fluoróforo aceptor. Selvin, *Nat. Struct. Biol.*, 7: 730-34 (2000). La transferencia de energía tiene lugar solamente si el fluoróforo donante está suficientemente próximo al fluoróforo aceptor. En un experimento de FRET típico, se marcan dos proteínas o dos sitios en una única proteína con diferentes sondas fluorescentes. Una de las sondas, la sonda donante, se excita a un estado de energía superior por luz incidente de una longitud de onda específica. La sonda donante transmite después su energía a la segunda sonda, la sonda aceptora, dando como resultado una reducción de la intensidad de fluorescencia del donante y un aumento de la emisión de fluorescencia del aceptor. Para medir
40 alcance de la transferencia de energía, la intensidad del donante en una muestra marcada con sondas donantes y aceptoras se compara con su intensidad en una muestra marcada con solamente sonda donante. Opcionalmente, la intensidad del aceptor se compara en muestras de donante/aceptor y solamente aceptor. Se conocen en la técnica sondas adecuadas e incluyen, por ejemplo, colorantes permanentes de membrana, tales como fluoresceína y rodamina, colorantes orgánicos, tales como los colorantes de cianina y átomos de lantánidos. Selvin, anteriormente citado. También se conocen en la técnica métodos e instrumentación para detectar y medir la transferencia de energía. Selvin, anteriormente citado.

También se conocen en este campo técnicas basadas en FRET adecuadas para detectar y medir interacciones proteína-proteína en células individuales. Por ejemplo, puede usarse microscopía de transferencia de energía por
55 resonancia de fluorescencia de fotoblanqueado del donante (pbFRET) y microscopía de captura de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) para detectar la dimerización de receptores de superficie celular. Selvin, anteriormente citando; Gadella & Jovin, *J. Cell Biol.*, 129: 1543-58 (1995). En una realización, se usa pbFRET en células bien “en suspensión” o bien “*in situ*” para detectar y medir la formación de dímeros EGFR-HER2 o HER2-HER3, como se describe en Nagy *et al.*, *Cytometry*, 32: 120-131 (1998). Estas técnicas miden la reducción del tiempo de vida de fluorescencia de un donante debido a la transferencia de energía.

60 Puede usarse una técnica de citometría de flujo FRET de tipo Foerster (FCET) para investigar la dimerización de EGFR-HER2 y HER2-HER3, como se describe en Nagy *et al.*, anteriormente citado, y Brockhoff *et al.*, *Cytometry*, 44: 338-48 (2001).

65

FRET se usa preferentemente junto con técnicas de marcaje inmunohistoquímico convencionales. Kenworthy, *Methods*, 24: 289-96 (2001). Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos conjugados con colorantes fluorescentes adecuados como sondas para marcar dos proteínas diferentes. Si las proteínas están próximas entre sí, los colorantes fluorescentes actúan como donantes y aceptores para FRET. Se detecta transferencia de energía por medios convencionales. La transferencia de energía puede detectarse por medios de citometría de flujo o por sistemas de microscopía digital, tales como microscopía confocal o microscopía de fluorescencia de campo amplio acoplada con una cámara de dispositivo acoplado a carga (CCD).

Opcionalmente, los anticuerpos de HER2 y anticuerpos bien de EGFR o bien de HER3 se marcan directamente con dos fluoróforos diferentes, por ejemplo como se describe en Nagy *et al.*, anteriormente citado. Se ponen en contacto células tumorales o lisados de células tumorales con los anticuerpos marcados diferencialmente, que actúan como donantes y aceptores para FRET en presencia de dímeros de EGFR-HER2 o HER2-HER3. Como alternativa, se usan anticuerpos no marcados contra HER2 y bien EGFR o bien HER3 junto con anticuerpos secundarios marcados diferencialmente que sirven como donantes y aceptores. Véase, por ejemplo, Brockhoff *et al.*, anteriormente citado. Se detecta la transferencia de energía y se determina la presencia de dímeros si se descubre que los marcadores están en proximidad estrecha.

Los ligandos de receptor HER que son específicos para HER2 y bien EGFR o bien HER3 pueden marcarse con fluorescencia y usarse para estudios FRET.

La presencia de dímeros en la superficie de células tumorales puede demostrarse por co-localización de HER2 con EGFR o HER3 usando técnicas de inmunofluorescencia directa o indirecta a convencionales y microscopía de barrido de láser confocal. Como alternativa, se usa captura de imágenes de barrido con láser (LSI) para detectar la unión de anticuerpo y co-localización de HER2 con EGR o HER3 en un formato de alto rendimiento, tal como una placa de micropocillos, como se describe en Zuck *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 11122-27 (1999).

La presencia de dímeros de EGFR-HER2 y/o HER2/HER3 puede determinarse identificando la actividad enzimática que depende de la proximidad de los componentes diméricos. Un anticuerpo de HER2 se conjuga con una enzima y un anticuerpo de EGFR o HER3 se conjuga con una segunda enzima. Se añade un primer sustrato para la primera enzima y la reacción produce un segundo sustrato para la segunda enzima. Esto conduce a una reacción con otra molécula para producir un compuesto detectable, tal como un colorante. La presencia de otro producto químico degrada el segundo sustrato, de modo que se evita la reacción con la segunda enzima a no ser que las primera y segunda enzima, y por lo tanto los dos anticuerpos, estén en proximidad estrecha. En una realización particular, se ponen en contacto células tumorales o lisados celulares con un anticuerpo de HER2 que está conjugado con glucosa oxidasa y un anticuerpo de HER3 o HER1 que está conjugado con peroxidasa de rábano picante. Se añade glucosa a la reacción, junto con un precursor de colorante, tal como DAB y catalasa. La presencia de dímeros se determina por el desarrollo del color tras la tinción con respecto a DAB.

También pueden detectarse dímeros usando métodos basados en el sistema de ensayo eTag™ (Aclara Bio Sciences, Mountain View, CA), como se describe, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2001/0049105, publicada el 6 de diciembre 2001. Un eTag™ o "marcador electroforético" comprende un resto reportero detectable, tal como un grupo fluorescente. También puede comprender un "modificador de movilidad" que consiste esencialmente en un resto que tiene una movilidad electroforética única. Estos restos permiten la separación y detección del eTag™ de una mezcla compleja en condiciones electroforéticas definidas, tales como electroforesis capilar (CE). La parte del eTag™ que contiene el resto reportero y, opcionalmente, el modificador de movilidad está ligado a un primer resto de unión a diana por un grupo de enlace escindible para producir un primer compuesto de unión. El primer resto de unión con diana reconoce específicamente una primera diana particular, tal como un ácido nucleico o proteína. El primer resto de unión a diana no está limitado de ninguna manera, y puede ser por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido. Preferentemente, el primer resto de unión a diana es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Como alternativa, el primer resto de unión a diana puede ser un ligando de receptor HER o fragmento competente para unión del mismo.

El grupo de enlace preferentemente comprende un resto escindible, tal como un sustrato enzimático, o cualquier enlace químico que pueda escindirse en condiciones definidas. Cuando el primer resto de unión de diana se une con su diana, el agente de escisión se introduce y/o se activa y se escinde el grupo de enlace, liberando de este modo la parte de eTag™ que contiene el resto indicador y modificador de movilidad. Por lo tanto, la presencia de un eTag™ "libre" indica la unión del resto de unión a diana con su diana.

Preferentemente, un segundo compuesto de unión comprende el agente de escisión y un segundo resto de unión a diana que reconoce específicamente una segunda diana. El segundo resto de unión a diana tampoco está limitado de ninguna manera y puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o un ligando de receptor HER o fragmento de ligando competente para unión. El agente de escisión es tal que escindirá solamente el grupo de enlace en el primer compuesto de unión si el primer compuesto de unión si el segundo compuesto de unión está en proximidad estrecha.

Opcionalmente, un primer compuesto de unión comprende un eTag™ en el que un anticuerpo para HER2 actúa como el primer resto de unión a diana. Un segundo compuesto de unión comprende un anticuerpo para EGFR o HER3 unido con un agente de escisión capaz de escindir el grupo de enlace del eTag™. Preferentemente, el agente de enlace debe activarse para poder escindir el grupo de enlace. Las células tumorales o lisados de células tumorales se ponen en contacto con el eTag™, que se une con HER2, y con el anticuerpo de EGFR o HER3 modificado, que se une con EGFR o HER3 en la superficie celular. El compuesto de unión no unido preferentemente se retira, y se activa el agente de escisión si es necesario. Si están presentes dímeros EGFR-HER2 o HER2-HER3, el agente de escisión escindirá el grupo de enlace y liberará el eTag™ debido a la proximidad del agente de escisión al grupo de enlace. Después puede detectarse eTag™ libre por cualquier método conocido en la técnica, tal como electroforesis capilar.

Opcionalmente, un agente de escisión es una especie química activable que actúa en el grupo de enlace. Por ejemplo, el agente de escisión puede activarse exponiendo la muestra a la luz.

Opcionalmente, el eTag™ se construye usando un anticuerpo para EGFR o HER3 como el primer resto de unión a diana y el segundo compuesto de unión se construye a partir de un anticuerpo para HER2.

Opcionalmente, el dímero de HER se detecta usando un anticuerpo u otro reactivo que se une específica o preferentemente con el dímero en comparación con la unión del mismo con uno de los receptores HER en el dímero.

(ii) Fosforilación de HER2

La inmunoprecipitación con anticuerpo de EGFR, HER2 o HER3 como se ha analizado en la sección anterior puede seguirse opcionalmente de un ensayo funcional con respecto a dímeros, como una alternativa o complemento a la inmunotransferencia. Opcionalmente, la inmunoprecipitación con el anticuerpo HER3 se sigue de un ensayo con respecto a la actividad de receptor tirosina quinasa en el inmunoprecipitado. Debido a que HER3 no tiene actividad tirosina quinasa intrínseca, la presencia de actividad tirosina quinasa en el inmunoprecipitado indica que HER3 se asocia más probablemente con HER2. Graus-Porta *et al.*, EMBO J., 16: 1647-55 (1997); Klapper *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 4995-5000 (1999). Este resultado puede confirmarse por inmunotransferencia con anticuerpos de HER2. Opcionalmente, la inmunoprecipitación con anticuerpo de HER2 se sigue de un ensayo con para la actividad tirosina quinasa del receptor EGFR. En este ensayo, el inmunoprecipitado se pone en contacto con ATP radioactivo y un sustrato peptídico que imita el sitio *in vivo* de transfosforilación de HER2 por EGFR. La fosforilación del péptido indica co-inmunoprecipitación y por lo tanto dimerización de EGFR con HER2. Se conocen bien en la técnica ensayos de la actividad del receptor tirosina quinasa e incluyen ensayos que detectan la fosforilación de sustratos diana, por ejemplo, por el anticuerpo de fosfotirosina, y la activación de rutas de transducción de señal afines, tales como la ruta de MAPK.

La fosforilación del receptor HER puede evaluarse por inmunoprecipitación de uno o más receptores HER, tales como receptor HER2 (HER2), y análisis de transferencia de Western. Por ejemplo, la positividad se determina por la presencia de una banda de fosfo-HER2 en el gel, usando un anticuerpo anti-fosfotirosina para detectar el resto o los restos de tirosina fosforilada en el receptor o los receptores HER inmunoprecipitados. Están disponibles en el mercado anticuerpos anti-fosfotirosina de PanVera (Madison, WI), una filial de Invitrogen, Chemicon International Inc. (Temecula, CA) o Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). La negatividad se determina por la ausencia de la banda.

Opcionalmente se evalúa la fosforilación del receptor HER2 (HER2) por inmunohistoquímica usando un anticuerpo de HER2 fosfo-específico (clon PN2A; Thor *et al.*, J. Clin. Oncol., 18(18): 3230-3239 (2000)).

Otros métodos para detectar la fosforilación del receptor o los receptores HER incluyen, pero sin limitación, ELISA KIRA (Patentes de Estados Unidos Nº 5.766.863; 5.891.650; 5.914.237; 6.025.145; y 6.287.784), espectrometría de masas (que compara el tamaño de HER2 fosforilado y no fosforilado) y ensayo de proximidad de e-tag tanto con un anticuerpo de HER (por ejemplo HER2) como con un anticuerpo fosfo-específico o específico de fosfo-tirosina (por ejemplo usando el kit de ensayo de eTag™ disponible de Aclara BioSciences (Mountain View, CA). Se han descrito anteriormente en el presente documento detalles del ensayo de eTag.

También se pueden usar anticuerpos fosfo-específicos en matriz celular para detectar el estado de fosforilación en una muestra celular de proteína de transducción de señal (documento US 2003/0190689).

(iii) Ligandos de HER2

Los niveles de un ligando de HER, tal como TGF- α , en o asociado con el tumor pueden determinarse de acuerdo con procedimientos conocidos. Dichos ensayos pueden detectar la proteína y/o el ácido nucleico que la codifica en la muestra para ensayar. En una realización, pueden determinarse los niveles de ligando de HER en el tumor usando inmunohistoquímica (IHC); véase, por ejemplo, Scher *et al.* Clin. Cancer Research 1: 545-550 (1995). Como alternativa, o adicionalmente, se pueden evaluar niveles del ácido nucleico que codifica el ligando de HER en la muestra para ensayar; por ejemplo, mediante FISH, transferencia de southern o técnicas de PCR.

(iv) *Cáncer que no sobreexpresa HER2*

5 Aunque el cáncer puede caracterizarse por la sobreexpresión del receptor HER2, la presente solicitud se refiere a un método para tratar el cáncer que no se considera que sobreexpresa HER2.

10 Para determinar la expresión de HER2 en el cáncer, están disponibles diversos ensayos de diagnóstico/pronóstico. En una realización, la sobreexpresión de HER2 puede analizarse por IHC, por ejemplo usando el HERCEPTEST® (Dako). Pueden someterse secciones tisulares incluidas en parafina de una biopsia tumoral al ensayo de IHC y se les otorga unos criterios de intensidad de tinción de proteína HER2 de la siguiente manera:

15 Puntuación 0 no se observa tinción o se observa tinción de membrana en menos del 10 % de células tumorales.
 Puntuación 1+ se detecta una tinción de membrana leve/apenas perceptible en más del 10 % de las células tumorales. Las células se tiñen solamente en parte de su membrana.
 Puntuación 2+ se observa una tinción de membrana de débil a moderada completa en más del 10 % de las células tumorales.
 Puntuación 3+ se observa una tinción de membrana de moderada a fuerte completa en más del 10 % de las células tumorales.

20 Puede caracterizarse que los tumores con puntuaciones 0 o 1+ con respecto a evolución de la sobreexpresión de HER2 no sobreexpresan HER2, mientras que puede caracterizarse que los tumores con puntuaciones 2+ o 3+ sobreexpresan HER2.

25 Los tumores que sobreexpresan HER2 pueden clasificarse por puntuaciones inmunohistoquímicas correspondientes al número de copias de moléculas de HER2 expresadas por célula, y pueden determinarse de forma bioquímica.

30 0 = 0-10.000 copias/célula,
 1+ = a al menos aproximadamente 200.000 copias/célula,
 2+ = a al menos aproximadamente 500.000 copias/célula,
 3+ = a al menos aproximadamente 2.000.000 copias/célula.

35 La sobreexpresión de HER2 en el nivel 3+, que conduce a la activación independiente de ligando de la tirosina quinasa (Hudziak *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7159-7163 (1987)), se produce en aproximadamente el 30 % de los cánceres de mama, y en estos pacientes se reduce la supervivencia sin recaída y supervivencia general (Slamon *et al.*, Science, 244: 707-712 (1989); Slamon *et al.*, Science, 235: 177-182 (1987)). Como alternativa, o adicionalmente, pueden llevarse a cabo ensayos FISH tales como el INFORM™ (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (Vysis, Illinois) en tejido tumoral fijado en formalina, incluido en parafina para determinar el alcance (si lo hubiera) de la sobreexpresión de HER2 en el tumor.

40 Opcionalmente, el cáncer será uno que expresa (ypuede sobreexpresar) EGFR, pudiendo dicha expresión evaluarse como para los métodos para evaluar la expresión de HER2 como se ha observado anteriormente.

45 También puede evaluarse la sobreexpresión o amplificación del receptor HER o ligando de HER usando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo administrando una molécula (tal como un anticuerpo) que se une con la molécula a detectar y se marca con un marcador detectable (por ejemplo un isótopo radioactivo) y explorando externamente al paciente con respecto a la localización del marcaje.

VI. Tratamiento con la composición de anticuerpo de HER2

50 Se contempla que, de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo de HER2 puede usarse para tratar el cáncer. El cáncer comprenderá generalmente células que expresan HER2, de modo que el anticuerpo de HER2 en el presente documento es capaz de unirse con las células cancerosas. Diversos cánceres que pueden tratarse con la composición se enumeran en la sección de definiciones anterior.

55 También se contempla que el anticuerpo de HER2 puede usarse para tratar diversas enfermedades o trastornos no malignos, tales como enfermedad autoinmune (por ejemplo psoriasis); endometriosis; esclerodermia; restenosis; pólipos tales como pólipos del colon, pólipos nasales o pólipos gastrointestinales; fibroadenoma; enfermedad respiratoria; colecistitis; neurofibromatosis; enfermedad renal poliquística; enfermedades inflamatorias; trastornos cutáneos incluyendo psoriasis y dermatitis; enfermedad vascular; afecciones que implican la proliferación anómala de células epiteliales vasculares; úlceras gastrointestinales; enfermedad de Menetrier, adenomas secretores o síndrome de pérdida de proteínas; trastornos renales; trastornos angiogénicos; enfermedad ocular tal como degeneración macular relacionada con la edad, síndrome de presunta histoplasmosis ocular, neovascularización retiniana de retinopatía diabética proliferativa, vascularización retiniana, retinopatía diabética o degeneración macular relacionada con la edad; patologías asociadas con el hueso tales como osteoartritis, raquitismo y osteoporosis; daño posterior a un evento isquémico cerebral; enfermedades fibróticas o edematosas, tales como cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, tiroiditis, síndrome de hiperviscosidad sistémica, enfermedad de

- Osler Weber-Rendu, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, o edema posterior a quemaduras, traumatismo, radiación, ictus, hipoxia o isquemia; reacción de hipersensibilidad de la piel; retinopatía diabética y nefropatía diabética; síndrome de Guillain-Barre; enfermedad de injerto contra huésped o rechazo de trasplante; enfermedad de Paget; inflamación de huesos o articulaciones; fotoenvejecimiento (por ejemplo provocado por radiación de UV de la piel humana); hipertrofia prostática benigna; ciertas infecciones microbianas incluyendo patógenos microbianos seleccionados de adenovirus, hantavirus, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia spp.* y *Bordetella pertussis*; trombos provocados por agregación de plaquetas; afecciones reproductoras tales como endometriosis, síndrome de hiperestimulación ovárica, preeclampsia, hemorragia uterina disfuncional o menometrorragia; sinovitis; ateroma; nefropatías agudas y crónicas (incluyendo glomerulonefritis proliferativa y enfermedad renal inducida por diabetes); eccema; formación de cicatriz hipertrófica; choque endotóxico e infección fúngica; poliposis adenomatosa familiar; enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y degeneración cerebelosa; síndromes mielodisplásicos; anemia aplásica; lesión isquémica; fibrosis del pulmón, riñón o hígado; enfermedad de hipersensibilidad mediada por linfocitos T; estenosis pilórica hipertrófica infantil; síndrome obstructivo urinario; artritis psoriática; y tiroiditis de Hashimoto. Las indicaciones no malignas preferentes para terapia en el presente documento incluyen psoriasis, endometriosis, esclerodermia, enfermedad vascular (por ejemplo restenosis, aterosclerosis, enfermedad de las arterias coronarias o hipertensión), pólipos del colon, fibroadenoma o enfermedad respiratoria (por ejemplo, asma, bronquitis crónica, bronquiectasia o fibrosis quística).
- El tratamiento con el anticuerpo de HER2 dará como resultado una mejora en las señales o síntomas de enfermedad. Por ejemplo, cuando la enfermedad que se trata es cáncer, dicha terapia puede dar como resultado una mejora de la supervivencia (supervivencia general y/o supervivencia sin progresión) y/o puede dar como resultado una respuesta clínica objetiva (parcial o completa).
- Preferentemente, el anticuerpo de HER2 en la composición administrada es un anticuerpo desnudo. Sin embargo, el anticuerpo de HER2 administrado puede conjugarse con un agente citotóxico. Preferentemente, el inmunoconjugado y/o proteína de HER2 con el que se une se internaliza o internalizan por la célula, dando como resultado una eficacia terapéutica aumentada del inmunoconjugado en la destrucción de la célula cancerosa con la que se une. Opcionalmente, el agente citotóxico se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, calicheamicinas, ribonucleasas y endonucleasas de ADN. El anticuerpo de HER2 puede administrarse a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intra-cefalorraquídeo, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación. Se prefiere la administración intravenosa de la composición de anticuerpo.
- Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo de HER2 dependerá del tipo de enfermedad para tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo de HER2 se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y su respuesta al anticuerpo de HER2, y el criterio del médico a cargo. El anticuerpo de HER2 se administra convenientemente al paciente en un momento o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 50 µg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo de HER2 es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, bien, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o bien por infusión continua. El tiempo de infusión inicial para el anticuerpo de HER2 puede ser mayor que los tiempos de infusión posteriores, por ejemplo aproximadamente 90 minutos para la infusión inicial y aproximadamente 30 minutos para infusiones posteriores (si se tolera bien la infusión inicial). La dosificación preferente del anticuerpo de HER2 estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo de HER2). Puede administrarse una dosis de carga inicial superior, seguida de una o más dosis inferiores. El anticuerpo de HER2 puede administrarse como una dosis de carga de aproximadamente 840 mg seguida de aproximadamente 420 mg a aproximadamente cada 3 semanas. El anticuerpo de HER2 puede administrarse como una dosis de aproximadamente 1050 mg administrada aproximadamente cada 3 semanas.
- Otros agentes terapéuticos pueden combinarse con el anticuerpo de HER2. Dicha administración combinada incluye la coadministración o administración simultánea, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente hay un periodo de tiempo durante el que ambos (o todos) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Por lo tanto, el otro agente terapéutico puede administrarse antes de, o después de, la administración del anticuerpo de HER2. El tiempo entre al menos una administración del otro agente terapéutico y al menos una administración del anticuerpo de HER2 es preferentemente de aproximadamente 1 mes o menos, y más preferentemente de aproximadamente 2 semanas o menos. Como alternativa, el otro agente terapéutico y el anticuerpo de HER2 se administran simultáneamente al paciente, en una única formulación o formulaciones separadas.

Los ejemplos de otros agentes terapéuticos que pueden combinarse con el anticuerpo de HER2 incluyen uno cualquiera o más de: un agente quimioterapéutico, tal como un antimetabolito, por ejemplo gemcitabina; un segundo anticuerpo de HER2 diferente (por ejemplo, un anticuerpo de HER2 inhibidor del crecimiento tal como Trastuzumab, o un anticuerpo de HER2 que induce la apoptosis de una célula que sobreexpresa HER2, tal como 7C2, 7F3 o variantes humanizadas de los mismos); un segundo anticuerpo dirigido contra otro antígeno asociado a tumor, tal como EGFR, HER3, HER4; compuesto antihormonal, por ejemplo, un compuesto antiestrógeno tal como tamoxifeno, o un inhibidor de aromatasas; un cardioprotector (para prevenir o reducir cualquier disfunción miocárdica asociada con la terapia); una citocina; un fármaco dirigido a EGFR (tal como TARCEVA®, IRESSA® o Cetuximab); un agente anti-angiogénico (especialmente Bevacizumab comercializado por Genentech con la marca comercial AVASTIN™); un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de COX (por ejemplo un inhibidor de COX-1 o COX-2); fármaco antiinflamatorio no esteroideo, Celecoxib (CELEBREX®); inhibidor de farnesil transferasa (por ejemplo, Tipifarnib/ZARNESTRA® R115777 disponible de Johnson y Johnson o Lonafarnib SCH66336 disponible de Schering-Plough); anticuerpo que se une con la proteína oncofetal CA 125 tal como Oregovomab (MoAb B43.13); vacuna de HER2 (tal como vacuna de HER2 AutoVac de Pharmexia, o vacuna de proteína APC8024 de Dendreon, o vacuna de péptido de HER2 de GSK/Corixa); otra terapia de dirección a HER (por ejemplo, trastuzumab, cetuximab, gefitinib, erlotinib, CI1033, GW2016 etc.); inhibidor de Raf y/o ras (véase, por ejemplo, documento, WO 2003/86467); Doxil; Topotecan; taxano; GW572016; TLK286; EMD-7200; un medicamento que trata las náuseas tal como un antagonista de serotonina, esteroide o benzodiacepina; un medicamento que previene o trata la erupción cutánea o terapias de acné convencionales, incluyendo antibiótico tópico u oral; un medicamento reductor de la temperatura corporal tal como un acetaminofeno, difenhidramina o meperidina; factor de crecimiento hematopoyético, etc.

Son dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriormente las usadas en la actualidad y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y del anticuerpo de HER2. El tratamiento con la combinación de la composición anticuerpo de HER2 y otro agente terapéutico puede dar como resultado un beneficio terapéutico sinérgico, o mayor que el aditivo, al paciente.

Si se administra un agente químico terapéutico, éste se administra habitualmente a dosificaciones conocidas para el mismo, u opcionalmente reducidas debido a la acción combinada de los fármacos o efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico. Puede usarse la preparación y programas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como se determine de forma empírica por el experto en la materia. La preparación y los programas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)*.

Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a retirada quirúrgica de células cancerosas y/o radioterapia.

VII. Depósito de materiales

Las siguientes líneas celulares de hibridomas se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, Estados Unidos (ATCC):

Designación de anticuerpo	Nº de ATCC	Fecha del depósito
7C2	ATCC HB-12215	17 de octubre de 1996
7F3	ATCC HB-12216	17 de octubre de 1996
4D5	ATCC CRL 10463	24 de mayo de 1990
2C4	ATCC HB-12697	8 de abril de 1999.

Se ilustran más detalles de la invención por el siguiente Ejemplo no limitante.

Ejemplo

CARACTERIZACIÓN DE LAS COMPOSICIONES DE PERTUZUMAB

El Pertuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante, generado basándose en el marco conservado de IgG1 humano (□). Comprende dos cadenas pesadas (448 restos) y dos cadenas ligeras (214 restos). Las dos cadenas pesadas están ligadas por dos disulfuros intercatenarios y cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un disulfuro intercatenario. Hay un sitio de glucosilación ligado a N en la región Fc de pertuzumab en Asn-299 de las dos cadenas pesadas. El pertuzumab difiere de HERCEPTIN® (Trastuzumab) en las regiones de unión a epítomos de la cadena ligera (12 diferencias de aminoácidos) y la cadena pesada (30 diferencias de aminoácidos). Como resultado de estas diferencias, el pertuzumab se une con un epítomo completamente diferente en el receptor HER2. La unión de pertuzumab con el receptor HER2 en células epiteliales humanas evita que forme complejos con otros miembros de la familia del receptor HER (Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)). Bloqueando la formación de complejos, el pertuzumab evita los efectos estimuladores del crecimiento de ligandos

para los complejos (por ejemplo, EGF y herregulina). Los experimentos *in vitro* demostraron que tanto pertuzumab como pertuzumab-Fab inhiben la unión de herregulina (HRG) a células MCF7 y que la fosforilación estimulada por HRG del complejo de HER2-HER3 puede inhibirse tanto por pertuzumab como por pertuzumab-Fab (Agus *et al.*, Cancer Cell 2: 127-137 (2002)). Además, se descubrió que la inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral por pertuzumab y un Fab derivatizado con polietilenglicol de pertuzumab era comparable en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata murino (Agus *et al.*, Cancer Cell 2: 127-137 (2002)). Estos datos sugieren que la región Fc del anticuerpo no es necesaria para la inhibición del crecimiento tumoral, y además, no se requiere bivalencia y funciones efectoras mediadas por Fc para actividad biológica *in vivo* o *in vitro*.

Se analizaron las siguientes muestras expresadas por células del Ovario de Hámster Chino (CHO) modificadas por ingeniería genética recombinante:

Muestra	Proceso de fabricación	Escala
Material de referencia	Fase I	400 I
Lote S9802A	Fase II	2000 I
Materiales de Desarrollo de Proceso (Ciclos 1, 2, 3, 5 y 6)	Programa de desarrollo clínico incluyendo Fase III	400 I

Nota: El ciclo de 4 de 400 I no está disponible debido a la contaminación en el cultivo del inóculo de 100 I el Día 2.

ANÁLISIS DE SECUENCIA N-TERMINAL

Se realizó un análisis de secuencia N terminal usando métodos de degradación de Edman convencionales, y los resultados se muestran en la Tabla 2A, Tabla 2B y Tabla 2C con respecto al Material de Referencia, Lote S9802A, y el material de desarrollo de proceso de Ciclo 1 a escala de 400 I respectivamente. Se observaron las secuencias N-terminales esperadas (Figura 4A y 3B) de las cadenas ligera y pesada en todas las muestras. También se detectó una secuencia menor adicional correspondiente a la cadena ligera con tres aminoácidos adicionales Val-His-Ser (VHS) que preceden a la secuencia N-terminal esperada en las cinco muestras. La secuencia VHS es una parte del péptido señal que se retira de la proteína a medida que se secreta. Una escisión alternativa del péptido señal da como resultado la extensión de la VHS en el extremo N-terminal de pertuzumab. En los materiales previamente producidos para estudios clínicos de Fase I/II, aproximadamente el 2 %-4 % de las moléculas de pertuzumab tenían una de las dos cadenas ligeras que contenían la secuencia VHS N-terminal. Sin embargo, el nivel de cadenas ligeras con secuencia VHS N-terminal en estos materiales (1 %-2 % de cada cadena ligera) era demasiado bajo para detectarse en el análisis de secuencia N-terminal. En las cinco muestras de desarrollo del proceso, el nivel de esta especie de cadena ligera es ligeramente superior al límite de detección del análisis N-terminal en aproximadamente 4 %-5 %. Los datos de secuenciación N-terminal para las cinco muestras de desarrollo del proceso son coherentes con los resultados cromatográficos de intercambio catiónico, que muestran que las cinco muestras de desarrollo del proceso tienen aproximadamente 9 % de las moléculas de pertuzumab con una cadena ligera que contiene la extensión VHS (véase Cromatografía de Intercambio Catiónico) (CEC) posterior).

No se detectaron otras secuencias (límite de detección estimado al 3 %), que indiquen la ausencia de sitios de escisión internos.

ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las muestras de Pertuzumab se redujeron con ditiotreitol y se analizaron por espectrometría de masas de ionización-electropulverización (ESI-MS) usando un espectrómetro de masas PE SCIEX API 3000™ para confirmar que las masas de las cadenas pesadas y ligeras en coherentes con sus secuencias esperadas. Los espectros de masas reconstruidos para el material de referencia, Lote S9802A, y el material de desarrollo de proceso de Ciclo 1 a escala de 400 I se comparan en la Figura 8A y la Figura 8B. La masa de cadena ligera observada (23.524 Da) es coherente con el valor predicho a partir de su secuencia para los tres materiales. Se observaron dos picos menores adicionales a 23.685 Da y 23.847 Da (161 y 323 Da mayores que la masa de cadena ligera, respectivamente). El primer pico (23.685 Da) probablemente surja de la glucosilación en la cadena ligera. El segundo tipo (23.847 Da) se observa más claramente en los materiales de desarrollo del proceso a escala de 400 I. Este pico es supuestamente de la cadena ligera con la extensión Val-His-Ser (véase el análisis de secuencia N-terminal anterior y el análisis cromatográfico de intercambio catiónico) o la cadena ligera con dos sitios de glucosilación.

Se observaron varias masas correspondientes a diferentes formas de la cadena pesada. La especie predominante de la cadena pesada tiene una masa de 50.532 Da, que surge de la cadena pesada que consiste en los restos 1-488 con una estructura de oligosacárido G0. Otras formas observadas incluyen la cadena pesada que contiene los restos 1-448 con una estructura de oligosacárido G1 o G2 (Figura 8B).

HETEROGENEIDAD DE CARGA POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIÓNICO Y ELECTROFORESIS DE ZONA CAPILAR

Se usó cromatografía de intercambio catiónico (CEC) para evaluar la heterogeneidad de carga en Pertuzumab. Se analizaron muestras antes y después del tratamiento con carboxipeptidasa B (CBP), con una columna de

intercambio catiónico DIONEX™ (PROPAC WCX-10™, 4 mm x 250 mm) usando un tampón de MES 20 mM, pH 6,0, y gradiente de NaCl de poca profundidad. La comparación de cromatogramas se muestra en la Figura 9A (antes del tratamiento con CPB) y la Figura 9B (después del tratamiento con CPB). Se observaron múltiples picos en los tres lotes. Para fines de caracterización, los cromatogramas se dividen en seis regiones (marcadas A a F en la Figura 9A y 9B). Se enumeran áreas de pico relativas para las seis regiones en la Tabla 3A y la Tabla 3B. La cantidad de variante ácida (en región A) es mayor en el Lote S9802A y los materiales de desarrollo del proceso a escala de 400 l que en el Material de Referencia. Las variantes básicas en la región C y D, que se ha mostrado que contienen Pertuzumab con un resto de lisina C-terminal en una (región C) o ambas (región D) de las cadenas pesadas, se reducen en el Lote S9802A y los materiales de desarrollo del proceso a escala de 400 l en comparación con el Material de Referencia. Después del tratamiento con PCB, las moléculas de Pertuzumab con una o dos lisinas C-terminales en una cadena pesada se convirtieron a la especie principal en la región B y ya no se detectaron en la región C y D. Solamente un pico pequeño, cuya identidad aún no se ha determinado, permaneció en la región C después del tratamiento con CPB. La variante básica en la región E, que se muestra que surge de las moléculas de Pertuzumab con una cadena ligera que contiene la expresión VHS, es mayor en los materiales de desarrollo del proceso a escala de 400 l (9 %-10 %) que en el Material de Referencia y el Lote S9802A (4 %). Se ha mostrado que la variante básica en la región F es Pertuzumab que contiene extensión VHS N-terminal en una cadena ligera y una lisina C-terminal en una cadena pesada. Como resultado de niveles mayores de variantes ácidas y básicas, la especie principal en la región B es menor en los materiales de desarrollo del proceso a escala de 400 l que en el Material de Referencia o Lote S9802A.

Además de la cromatografía de intercambio catiónico, se empleó electroforesis de zona capilar (CZE) para examinar la heterogeneidad de carga en Pertuzumab. Se identificaron los picos de CZE y se correlacionaron con los picos observados en análisis de CEC analizando fracciones de CEC recogidas individualmente con CZE. Las cantidades relativas de variantes de carga determinadas por CZE y CEC son comparables para todos los materiales analizados.

Las actividades biológicas de las variantes de carga de Pertuzumab en diferentes fracciones CEC parecen ser iguales basándose en un ensayo anti-proliferación basado en células. Por lo tanto, no se espera que la heterogeneidad de carga en Pertuzumab afecte a su potencia. Las actividades biológicas de los materiales de desarrollo del proceso de 400 l son comparables a las del Material de Referencia y Lote S9802A (véase Actividad Biológica y Tabla 4).

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO

Se usó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para determinar el grado de agregación en Pertuzumab. Se analizaron muestras en una columna TOSOHAAS TSK G3000SWXLT™ (7,8 mm x 300 mm). Se usó elución isocrítica (fosfato potásico 100 mM, pH 6,8, 0,5 ml/minuto) con absorbancia ultravioleta (UV) controlada a 280 nm. Se presentan los datos de SEC para el Material de Referencia, Lote S9802A y el material de desarrollo del proceso de Ciclo 1 a escala de 400 l en la Figura 10. El monómero está uniformemente a más de 99,6 % por área de pico, y el agregado está por debajo de 0,3 % en todos los materiales analizados.

ANÁLISIS DE CE-SDS-LIF

Se usó también análisis de dodecil sulfato sódico-electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser (CE-SDS-LIF) para evaluar la pureza de las muestras de Pertuzumab. Se observaron electroferogramas similares para el Material de Referencia, Lote S9802A, y el material de desarrollo del proceso de Ciclo 1 a escala de 400 l con y sin reducción (Figs. 11A y 11B). Los niveles de cadena pesada no glucosilada determinados a partir de los electroferogramas de materiales reducidos están entre 2,6 % y 4,3 % (con respecto a la cadena pesada total). Las cantidades de agregados en estas muestras (no reducidas) determinadas por análisis de CE-SDS-LIF son coherentes con los resultados de SEC. No se encontraron pruebas de fragmentos de productos significativos u otras impurezas en el análisis de CE-SDS-LIF de estas muestras. Los datos de CE-SDS-LIF sugieren que el perfil de impurezas de los materiales de desarrollo del proceso a escala de 400 l es similar a los del Material de Referencia y el Lote S9802A.

ANÁLISIS DE SDS-PAGE

Se realizó el análisis de electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) (gel T 4 %-20 % (Daiichi Pure Chemicals Co., Tokio, Japón) con tinción con SYPRORUBY™) para comparar las muestras reducidas e intactas del Material de Referencia, Lote S9802A y los materiales de desarrollo del proceso a escala de 400 l. No se observaron nuevas bandas en los materiales de desarrollo del proceso a escala de 400 l, lo indica de nuevo que el perfil de impurezas general en los materiales de desarrollo del proceso a escala de 400 l es similar al Material de Referencia y el Lote S9802A.

ANÁLISIS DE MAPEO DE PÉPTIDOS TRÍPTICOS Y LYS-C

Se realizaron análisis de mapeo de péptidos trípticos y Lys-C para examinar y comparar la estructura primaria de Pertuzumab en el Material de Referencia, Lote S9802A y los materiales de desarrollo de proceso a escala de 400 l.

Se dirigieron alícuotas de Pertuzumab reducido y S-carboximetilado y se dirigieron alícuotas de Pertuzumab reducido y sulfitolizado con endoproteinasa Lys-C. La digestión con tripsina se separó por cromatografía de fase inversa usando una columna VYDAC C-18™ (4,6 mm x 250 mm) con un gradiente de acetonitrilo del 0 %-60 %. Se controló la absorbancia a 214 nm, y se determinaron las masas peptídicas por ESI-MS usando un THERMO FINNIGAN LCQ™. El producto de digestión de Lys-C se separó por cromatografía de fase inversa usando una columna ZORBAX C-8™ (4,6 mm x 150 mm) con un gradiente de alcohol isopropílico 0 %-100 % (IPA). La absorbancia se controló a 214 nm, y se determinaron las masas peptídicas por ESI-MS usando un THERMO FINNIGAN LCQ™.

Los mapas peptídicos trípticos y de Lys-C para el Material de Referencia, el Lote S9802A y el material de desarrollo de proceso de Ciclo 1 a escala de 400 l se comparan en la Figura 12A y Figura 12B, respectivamente. Los mapas tanto tríptico como de Lys-C para los tres materiales son esencialmente idénticos. La mayoría de los péptidos se identificaron por LC-MS y se compararon con una masa peptídica esperada. Los péptidos trípticos observados identificaron el 97,1 % (436/449) de los restos de cadena pesada y el 95,8 % (205/214) de los restos de cadena ligera. La cobertura de secuencia es del 98,4 % (442/449) y 70,6 % (151/214) para la cadena pesada y ligera, respectivamente, en el mapa de Lys-C. Se descubrió que el péptido N-terminal que contenía la extensión de VHS para eluir conjuntamente con el péptido N-terminal sin la extensión VHS en el mapa de péptido tríptico por LC-MS. No se detectaron cantidades significativas de péptidos desamidados u oxidados en los mapas peptídicos.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La actividad biológica de Pertuzumab se determinó midiendo su capacidad para inhibir la proliferación de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-175-VII. El porcentaje de actividades específicas obtenido para cinco muestras de desarrollo de proceso a escala de 400 l (Tabla 4) están en el intervalo de 90 %-96 % y son similares a las actividades para el Material de Referencia (100 % por definición) y el Lote S9802A (98 % indicado en el Certificado de Análisis). Como se esperaba, la heterogeneidad de carga no afecta a la potencia de Pertuzumab. Todos los materiales tienen actividades anti-proliferación comparables.

ANÁLISIS DE OLIGOSACÁRIDOS LIGADOS A N

Parte de la heterogeneidad de masa en la cadena pesada surge de la glucosilación en Asn-299. Para evaluar la heterogeneidad de los oligosacáridos, se digirieron muestras de Pertuzumab durante una noche con PNGasa F para liberar los glucanos ligados a N. Los oligosacáridos liberados se derivatizaron después con el fluoróforo 9-amino-1,4,6-trisulfonato (APTS). Las formas de glucano individuales se separaron por electroforesis capilar (CE) (Beckman P/ACE 5500 CE equipado con capilar recubierto de Beckman) y se cuantificaron con detección de fluorescencia.

Los electroferogramas de análisis de CE de los oligosacáridos neutros liberados del Material de Referencia, el Lote S9802A y el material de desarrollo del proceso de Ciclo 1 a escala de 400 l se muestran en la Figura 13. Para referencia, las estructuras de oligosacáridos halladas habitualmente en anticuerpos IgG1 humanos, y un sumario de la nomenclatura usada se incluyen en las Figuras 14A y 14B. Se resumen cantidades relativas de los oligosacáridos en todos los materiales en la Tabla 5.

Los oligosacáridos con estructuras G0 y G1 son los glucanos predominantes. También se observaron picos que surgían de otras estructuras de oligosacáridos en los electroferogramas. Estas estructuras incluyen glucoformas G2, G0-F, G-1, Man5 y G1-1 (o Man6). Además, las isoformas se resuelven. Las distribuciones de glucanos observados son similares en todos los materiales (Tabla 5). Sin embargo, en comparación con los Materiales de Referencia y materiales de desarrollo del proceso a escala de 400 l, el material de Fase II (Lote S9802A) tiene una cantidad menor de glucanos con una estructura G0 y más glucanos con estructura G1. A pesar de las diferencias en la distribución de glucanos, todos los materiales tienen actividades biológicas similares. Además, el cambio en la heterogeneidad de glucanos no tuvo un impacto significativo en la afinidad de unión de Pertuzumab por FcRn (Tabla 6) o receptores Fc gamma (Tabla 7) (véase Receptor FcRn y Ensayos de Unión de Receptor Fc Gamma).

Los oligosacáridos neutros liberados también se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI-TOF/MS). Los espectros de MALDI-TOF para los oligosacáridos neutros liberados del Material de Referencia, Lote S9802A y material de desarrollo del proceso de Ciclo 1 a escala de 400 l se comparan en la Figura 15. La estructura y distribución de glucanos obtenida de análisis de MALDI-TOF/MS son coherentes con los resultados de CE.

ANÁLISIS DE ISOELECTROENFOQUE CAPILAR

Se usó isoelectroenfoque capilar (cIEF) para determinar el pI de Pertuzumab en el Material de Referencia, el Lote S9802A y el material de desarrollo del proceso de Ciclo 1 a escala de 400 l. Aunque las cantidades relativas de las diferentes especies de carga en estos materiales fueron algo diferentes como se observa en el análisis CE, se descubrió que el pI de la especie principal era de 8,7 en todas las muestras.

65

ANÁLISIS DE SULFIHIDRILLO LIBRE

El Material de Referencia, el Lote S9802A y los materiales de desarrollo del proceso a escala de 400 l se ensayaron con respecto a tiol libre (resto de cisteína no emparejado) usando el análisis de Ellman. El nivel de tiol libre estaba por debajo del límite de detección (aproximadamente 0,05 moles de tiol libre por mol de proteína) en todos los materiales ensayados.

ENSAYO DE UNIÓN AL RECEPTOR FcRn

Las afinidades de unión al receptor FcRn de Pertuzumab del Material de Referencia, Lote S9802A y los materiales de desarrollo del proceso a escala de 400 l se compararon usando un ensayo ELISA similar al descrito en Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001). El Material de Referencia se usó como un patrón en este ensayo.

Se recubrieron en primer lugar placas de micropocillos de 96 pocillos MAXISORP™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con NEUTRAVADIN™ (Pierce, Rockford, IL) a 4 °C durante una noche. Después se añadió FcRn humano biotilado a las placas a 2 µg/ml y se incubó durante una hora. Se añadieron once diluciones en serie dobles de muestras de Pertuzumab (3,1-3200 ng/ml) a las placas y se incubaron durante dos horas. Se detectó el Pertuzumab unido añadiendo F(ab')₂ IgG anti-F(ab')₂ humano de cabra marcado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y usando 3,3'-5,5'-tetrametil bencidina (TMB) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) como el sustrato. La absorbancia se leyó a 450 nm en un lector TITERKET MULTISKAN™ (MCC/340) (INC, Costa Mesa, CA). La afinidad de unión del FcRn de Pertuzumab también se evaluó en un segundo formato de ELISA en el que se recubrieron placas con HER2-ECD. Se añadieron muestras de Pertuzumab diluidas en serie a las placas y se incubaron durante dos horas. Las placas se lavaron y se añadieron 2 mg/ml de FcRn humano biotilado. Se detectó FcRn unido usando estreptavidina-HRP con TMB como el sustrato.

La absorbancia en el punto medio de una curva de valoración (DO-media) del patrón (es decir, Material de Referencia) y las concentraciones correspondientes del patrón y las muestras en esta DO-media se determinaron. La afinidad de unión relativa se calculó dividiendo la concentración de DO-media del patrón por la de la muestra.

Las afinidades de unión FcRn relativas obtenidas de ambos formatos de ELISA se enumeran en la Tabla 6. Los datos de los dos formatos de ELISA diferentes son comparables. Aunque las distribuciones de glucanos en diferentes materiales de Pertuzumab no son idénticas, las afinidades de unión de FcRn de estos materiales son comparables, lo que indica que la heterogeneidad de glucanos en Pertuzumab no tiene ningún efecto aparente en su afinidad de unión a FcRn.

ENSAYO DE UNIÓN DEL RECEPTOR Fc GAMMA

Se evaluó la unión de Pertuzumab con los receptores Fc gamma (FcγR) por un ensayo de ELISA de acuerdo con Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001) con modificaciones.

La IgG monomérica puede unirse con el FcγRIa de alta afinidad (CD64); sin embargo, los receptores de baja afinidad (FcγRIIa (CD32A), FcγRIIb (CD32B) y FcγRIIIa (CD16)) requieren IgG multimérico para unión significativa. Por lo tanto, para los ensayos de unión de receptor de baja afinidad, se formaron multímeros de Pertuzumab antes del ensayo mezclando cada muestra (200 mg/ml) con cadena kappa anti-humana de cabra (400 mg/ml; ICN Biomedical, Irvine, CA). El FcγR humano se expresó como proteínas de fusión recombinantes del dominio extracelular de las cadenas alfa del receptor con Gly/His6/GST (glicina/6 histidinas/glutación-s-transferasa). Se usaron placas de ensayo bloqueadas con albúmina de suero bovino (BSA), recubiertas con anti-GST para capturar el FcγR. Los receptores (100 µl a 0,25 mg/ml) se añadieron a las placas y se incubaron durante 1 hora. Se añadieron diluciones en serie de muestras de Pertuzumab (100 µl) como monómeros para FcγRIa y como multímeros para el FcγR de baja afinidad, y las placas se incubaron durante dos horas. El Pertuzumab unido se detectó añadiendo F(ab')₂ anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) y usando TMB como sustrato. Se determinaron los valores de CE₅₀ para la unión de Pertuzumab con el FcγR por análisis de regresión no lineal con un modelo de cuatro parámetros (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, PA). Se usó RITUXAN® (Lote C2B81298-2) como el anticuerpo de control.

Los valores de CE₅₀ para la unión de Pertuzumab con FcγR se resumen en la Tabla 7. Los resultados muestran que el Material de Referencia, Lote S9802A y los materiales de desarrollo del proceso a escala de 400 l tienen afinidades de unión comparables para FcγR. Estos resultados sugieren que la heterogeneidad de glucanos en Pertuzumab no tiene ningún efecto significativo en sus afinidades de unión con FcγR.

ES 2 521 140 T3

Tabla 2A

Análisis de Secuencia N-terminal del Material de Referencia de Pertuzumab (nmoles del resto observados en cada ciclo)												
Resto	Ciclo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0,01	0,01	0,02	0,04	0,04	0,05	0,06	0,07	0,09	0,09	0,10	0,11
ARG	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,03	0,04	0,04	0,05	0,06	0,05	0,06
ASN	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,06	0,07
ASP	<u>0,48</u>	0,08	0,03	0,04	0,04	0,04	0,05	0,07	0,07	0,08	0,09	0,10
CYS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GLN	0,00	0,01	<u>0,92</u>	0,13	0,04	<u>0,46</u>	0,13	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09
GLU	0,49	0,05	0,13	0,03	0,03	0,51	0,12	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08
GLY	0,01	0,01	0,03	0,03	0,05	0,05	0,05	0,30	0,35	0,36	0,13	0,09
HIS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
ILE	0,00	<u>0,48</u>	0,06	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04
LEU	0,00	0,03	0,04	0,43	0,11	0,08	0,09	0,11	0,12	0,13	<u>0,62</u>	0,26
LYS	0,00	0,00	0,03	0,00	0,05	0,06	0,07	0,08	0,08	0,09	0,00	0,12
MET	0,00	0,00	0,00	0,53	0,07	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
PHE	0,00	0,01	0,02	0,02	0,03	0,04	0,05	0,05	0,06	0,07	0,07	0,08
PRO	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,04	0,05	<u>0,32</u>	0,13	0,09	0,09	0,10
SER	0,01	0,01	0,03	0,04	0,05	0,07	<u>0,56</u>	0,16	<u>0,30</u>	<u>0,33</u>	0,18	<u>0,28</u>
THR	0,00	0,01	0,00	0,04	<u>0,33</u>	0,12	0,07	0,07	0,08	0,09	0,10	0,10
TRP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02
TYR	0,01	0,01	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,08	0,09	0,10	0,11	0,13
VAL	0,01	0,51	0,08	0,10	0,53	0,15	0,11	0,12	0,14	0,15	0,16	0,51
Cadena Ligera	<u>QSP</u>	<u>ILE</u>	<u>GLN</u>	<u>MET</u>	<u>THR</u>	<u>GLN</u>	<u>SER</u>	<u>PRO</u>	<u>SER</u>	<u>SER</u>	<u>LEU</u>	<u>SER</u>
Cadena Pesada	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL

Nota: Se proporcionan los nanomoles de restos de aminoácidos de feniltiohidantoína observados en cada ciclo. Los restos de la cadena pesada se proporcionan en negrita, y los restos de la cadena ligera están subrayados. Se cargaron aproximadamente 0,5 nmoles de proteína, equivalentes a 1,0 nmoles de cada una de las cadenas ligera y pesada. No se observa cisteína (CYS) en el análisis de secuencia.

Tabla 2B

Análisis de Secuencia N-terminal de Pertuzumab Lote S9802A (nmoles del resto observados en cada ciclo)												
Resto	Ciclo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0,01	0,01	0,03	0,04	0,06	0,06	0,08	0,09	0,11	0,12	0,14	0,14
ARG	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,05	0,05	0,06	0,07	0,07	0,08
ASN	0,00	0,00	0,01	0,02	0,02	0,02	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
ASP	<u>0,61</u>	0,12	0,04	0,05	0,05	0,06	0,07	0,09	0,09	0,10	0,11	0,13
CYS	ND											
GLN	0,00	0,01	1,11	0,22	0,06	<u>0,55</u>	0,19	0,10	0,11	0,11	0,11	0,12
GLU	0,61	0,09	0,15	0,05	0,04	0,61	0,19	0,10	0,09	0,10	0,10	0,11
GLY	0,01	0,01	0,04	0,04	0,06	0,06	0,07	0,37	0,44	0,46	0,19	0,13
HIS	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02
ILE	0,00	<u>0,56</u>	0,10	0,02	0,04	0,04	0,03	0,04	0,05	0,05	0,05	0,06
LEU	0,00	0,04	0,05	0,51	0,17	0,11	0,12	0,14	0,15	0,17	<u>0,76</u>	0,37
LYS	0,00	0,00	0,04	0,00	0,06	0,08	0,09	0,10	0,11	0,12	0,00	0,16
MET	0,00	0,00	0,01	<u>0,61</u>	0,12	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03
PHE	0,00	0,01	0,03	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,09	0,10
PRO	0,00	0,01	0,02	0,03	0,05	0,06	0,06	<u>0,37</u>	0,18	0,12	0,12	0,13
SER	0,01	0,02	0,04	0,05	0,06	0,08	0,63	0,24	<u>0,36</u>	<u>0,41</u>	0,24	<u>0,35</u>
THR	0,00	0,01	0,00	0,05	<u>0,39</u>	0,17	0,10	0,10	0,11	0,12	0,13	0,14
TRP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
TYR	0,16	0,07	0,05	0,06	0,07	0,08	0,10	0,10	0,12	0,13	0,14	0,16
VAL	0,02	0,58	0,13	0,12	0,62	0,22	0,15	0,16	0,18	0,20	0,21	0,62
Cadena Ligera	<u>ASP</u>	<u>ILE</u>	<u>GLN</u>	<u>MET</u>	<u>THR</u>	<u>GLN</u>	<u>SER</u>	<u>PRO</u>	<u>SER</u>	<u>SER</u>	<u>LEU</u>	<u>SER</u>
Cadena Pesada	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL

Nota: Se proporcionan los nanomoles de restos de aminoácidos de feniltiohidantoína observados en cada ciclo. Los restos de la cadena pesada se proporcionan en negrita, y los restos de la cadena ligera están subrayados. Se cargaron aproximadamente 0,5 nmoles de proteína, equivalentes a 1,0 nmoles de cada una de las cadenas ligera y pesada.

ligera y pesada. No se observa cisteína (CYS) en el análisis de secuencia.

Tabla 2C

Análisis de Secuencia N-terminal de Pertuzumab de Ciclo 1 a Escala de 400 l (nmoles de resto observados en cada ciclo)												
Resto	Ciclo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0,01	0,02	0,03	0,05	0,06	0,06	0,08	0,10	0,11	0,13	0,14	0,14
ARG	0,03	0,05	0,07	0,09	0,17	0,15	0,20	0,23	0,24	0,29	0,30	0,33
ASN	0,00	0,00	0,01	0,02	0,02	0,03	0,04	0,06	0,07	0,08	0,09	0,09
ASP	<u>0,89</u>	0,08	0,05	<i>0,11</i>	0,08	0,09	0,11	0,15	0,14	0,16	0,18	0,19
CYS	ND	ND	ND	ND								
GLN	0,00	0,01	1,17	0,11	0,05	<u>0,60</u>	0,12	0,09	<i>0,14</i>	0,12	0,11	0,12
GLU	0,68	0,05	0,19	0,04	0,04	0,62	0,15	0,10	0,10	0,11	0,11	0,12
GLY	0,01	0,01	0,05	0,04	0,08	0,07	0,07	0,37	0,42	0,44	0,16	0,13
HIS	0,00	<i>0,02</i>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03
ILE	0,00	<u>0,56</u>	0,03	0,02	<i>0,07</i>	0,04	0,03	0,04	0,05	0,06	0,05	0,06
LEU	0,00	0,04	0,05	0,51	0,15	0,12	0,13	0,15	0,16	0,18	0,79	0,31
LYS	0,00	0,00	0,04	0,05	0,08	0,09	0,10	0,12	0,14	0,15	0,17	0,19
MET	0,00	0,00	0,01	<u>0,65</u>	0,04	0,02	<i>0,05</i>	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03
PHE	0,00	0,01	0,03	0,03	0,05	0,05	0,07	0,08	0,08	0,09	0,10	0,11
PRO	0,00	0,01	0,02	0,04	0,05	0,06	0,07	<u>0,41</u>	0,14	0,11	<i>0,13</i>	0,14
SER	0,01	0,02	<i>0,07</i>	0,06	0,08	0,10	0,76	0,21	<u>0,43</u>	0,48	0,23	<u>0,42</u>
THR	0,00	0,01	0,00	0,06	<u>0,57</u>	0,18	0,12	<i>0,16</i>	0,16	0,17	0,18	0,19
TRP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03
TYR	0,00	0,02	0,04	0,06	0,07	0,08	0,10	0,11	0,13	0,14	0,15	0,17
VAL	<i>0,04</i>	0,56	0,10	0,13	0,62	0,19	0,15	0,17	0,19	0,21	0,22	0,62
Cadena Ligera	<u>ASP</u>	<u>ILE</u>	<u>GLN</u>	<u>MET</u>	<u>THR</u>	<u>GLN</u>	<u>SER</u>	<u>PRO</u>	<u>SER</u>	<u>SER</u>	<u>LEU</u>	<u>SER</u>
Cadena Pesada	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL
Cadena Ligera-VHS	<i>VAL</i>	<i>HIS</i>	<i>SER</i>	<i>ASP</i>	<i>ILE</i>	<i>GLN</i>	<i>MET</i>	<i>THR</i>	<i>GLN</i>	<i>SER</i>	<i>PRO</i>	<i>SER</i>

Nota: Se proporcionan los nanomoles de restos de aminoácidos de feniltiohidantoína observados en cada ciclo. Los restos de la cadena pesada se proporcionan en negrita, y los restos de la cadena ligera están subrayados. Los restos de la secuencia de cadena ligera-VHS adicional se muestran en cursiva. Se cargaron aproximadamente 0,5 nmoles de proteína, equivalentes a 1,0 nmoles de cada una de las cadenas ligera y pesada. No se observa cisteína (CYS) en el análisis de secuencia.

Tabla 3A

Análisis Cromatográfico de Intercambio Catiónico de Pertuzumab Nativo (% de área de pico)						
Muestra	Pico de Variante de Intercambio Iónico					
	A	B	C	D	E	F
Material de Referencia	10	73	10	3	3	0,4
S9802A	20	68	5	2	4	0,2
Ciclo 1 a Escala de 400 l	16	65	5	2	10	0,9
Ciclo 2 a Escala de 400 l	15	67	5	2	9	0,6
Ciclo 3 a Escala de 400 l	15	67	6	2	10	0,6
Ciclo 5 a Escala de 400 l	15	67	5	2	9	0,5
Ciclo 6 a Escala de 400 l	13	63	9	3	9	0,6

Nota: El Ciclo 4 de 400 l no está disponible debido a la contaminación en el cultivo de inóculo de 100 l el Día 2.

5

Tabla 3B

Análisis Cromatográfico de Intercambio Catiónico de Pertuzumab Digerido con CPB (% de área de pico)						
Muestra	Pico de Variante de Intercambio Iónico					
	A	B	C	D	E	F
Material de Referencia	11	78	4	ND	4	ND
S9802A	20	71	3	ND	4	ND
Ciclo 1 a Escala de 400 l	17	68	3	ND	10	ND
Ciclo 2 a Escala de 400 l	15	71	3	ND	9	ND
Ciclo 3 a Escala de 400 l	15	71	3	ND	10	ND
Ciclo 5 a Escala de 400 l	17	70	3	ND	9	ND

ES 2 521 140 T3

Ciclo 6 a Escala de 400 l	16	71	3	ND	9	ND
---------------------------	----	----	---	----	---	----

Nota: Las fracciones A a F se definen en la Figura 9B. Todos los valores se redondean a dos cifras significativas. Los totales en cualquier fila pueden no sumar hasta el 100 % debido al redondeo. El Ciclo 4 de 400 l no está disponible debido a la contaminación del cultivo de inóculo de 100 l el Día 2.
ND = No detectado o no pudo integrarse.

Tabla 4

Actividades Específicas de Pertuzumab por un Ensayo Anti-proliferación basado en Células		
Material	Actividad Específica (%)	Cv (%)
Material de Referencia	100 ^a	-
S9802A 9	8 ^b	10
Ciclo 1 a Escala de 400 l	96 ^c	18
Ciclo 2 a Escala de 400 l	90 ^c	11
Ciclo 3 a Escala de 400 l	96 ^c	17
Ciclo 5 a Escala de 400 l	96 ^c	3
Ciclo 6 a Escala de 400 l	95 ^c	3

Nota: El Ciclo 4 de 400 l no está disponible debido a la contaminación del cultivo de inóculo de 100 l el Día 2.
^a Por definición, la actividad específica del Material de Referencia es 100 %.
^b Valor indicado para el Lote S9802A.
^c El valor representa la media de tres ensayos.

Tabla 5

Distribución de Estructuras de Oligosacáridos en Pertuzumab determinada por CE							
Muestra	%G0-F	%G-1	%Man5	%G0	%Man6+%G1-1	%G1 ^a	%G2
Material de Referencia	1	4	1	71	2	19	2
S9802A 9	1	4	1	62	2	27	3
Ciclo 1 a Escala de 400 l	2	6	1	73	3	15	2
Ciclo 2 a Escala de 400 l	1	6	1	77	2	13	1
Ciclo 3 a Escala de 400 l	2	6	1	74	4	14	1
Ciclo 5 a Escala de 400 l	1	5	1	71	2	18	1
Ciclo 6 a Escala de 400 l	1	5	1	71	3	18	1

El Ciclo 4 de 400 l no está disponible debido a la contaminación del cultivo de inóculo de 100 l el Día 2.
^a Suma de los dos isómeros G1.

5

Tabla 6

Afinidades de unión relativas de Pertuzumab por FcRn		
Muestra	Afinidad de Unión Relativa ^a	
	Formato de Recubrimiento de NeutrAvidin	Formato de Recubrimiento de Her2ECD
Material de Referencia (Patrón)	1,00	1,00
S9802A 9	1,34	1,30
Ciclo 1 a Escala de 400 l	1,04	1,22
Ciclo 2 a Escala de 400 l	1,09	1,31
Ciclo 3 a Escala de 400 l	1,14	1,42
Ciclo 5 a Escala de 400 l	1,22	1,36
Ciclo 6 a Escala de 400 l	1,06	1,29

Nota: El Ciclo 4 de 400 l no está disponible debido a la contaminación del cultivo de inóculo de 100 l el Día 2.
^a La absorbancia del punto medio de la curva de valoración (DO-media) del patrón (es decir, Material de Referencia) y las concentraciones correspondientes de patrón y muestras en esta DO-media se determinaron. La afinidad de unión relativa se obtuvo dividiendo la concentración de DO media del patrón por la de la muestra.

Tabla 7

Valores de CE ₅₀ para la unión de Pertuzumab con Receptores Fc Gamma										
Muestra	CE ₅₀ (µg/ml)									
	FcγRIa		FcγRIIa		FcγRIIb		FcγRIIIa (F158)		FcγRIIIa (V158)	
	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT
Material de Referencia	0,0081	0,0014	5,8	1,8	57	17	14,0	1,4	1,8	0,1
S9802A	0,0078	0,0020	5,4	1,9	45	17	7,8	0,3	1,1	0,1
Ciclo 1 a Escala de 400 l	0,0079	0,0013	5,4	1,5	70	25	8,4	0,9	1,2	0,1
Ciclo 2 a Escala de 400 l	0,0074	0,0016	5,8	1,6	54	18	10,4	0,7	1,4	0,2
Ciclo 3 a Escala de 400 l	0,0075	0,0015	5,5	1,1	54	10	8,2	0,9	1,2	0,1
Ciclo 5 a Escala de 400 l	0,0076	0,0011	6,1	2,7	50	12	10,9	1,5	1,4	0,2
Ciclo 6 a Escala de 400 l	0,0080	0,0005	6,2	1,9	44	1	10,3	0,9	1,4	0,2

Nota: Las medias y desviaciones típicas (DT) se obtuvieron de múltiples ciclos del ensayo (N=4).
 El receptor FcγRIIIa tiene dos versiones: F158 y V158.
 El Ciclo 4 de 400 l no está disponible debido a la contaminación del cultivo de inóculo de 100 l el Día 2.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

- 5 a) un especie principal de anticuerpo de HER2 que se une al dominio II de HER2, y comprende una secuencia de aminoácidos variable ligera proporcionada como SEC ID N°: 3 y una secuencia de aminoácidos variable pesada proporcionada como SEC ID N°: 4; y
 b) una variante de anticuerpo que comprende la especie principal de anticuerpo de HER2 y una extensión de líder amino-terminal que comprende VHS- en una cadena ligera de la variante de anticuerpo.

10 en la que del 5 % a aproximadamente el 15 % de las moléculas de anticuerpo en la composición comprenden la extensión líder amino-terminal, como se cuantifica por análisis de intercambio catiónico.

15 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la extensión líder amino-terminal es en dos cadenas ligeras de la variante de anticuerpo.

3. La composición de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en la que la especie principal de anticuerpo de HER2 y la variante de anticuerpo son ambas anticuerpos intactos.

20 4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la especie principal del anticuerpo de HER2 comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y de cadena pesada en SEC ID N°: 15 y 16, respectivamente.

25 5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la extensión líder amino-terminal consiste en VHS-.

6. La composición de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende además una segunda variante de la especie principal de anticuerpo de HER2, en donde la segunda variante de la especie principal de anticuerpo de HER2 se selecciona del grupo que consiste en:

- 30 (i) la especie principal de anticuerpo de HER2 que comprende un resto de lisina C-terminal en dos cadenas pesadas del mismo,
 (ii) la especie principal de anticuerpo de HER2 que comprende Asn-386 y/o Asn-391 desamidadas en una o dos cadenas pesadas del mismo, y
 35 (iii) la especie principal de anticuerpo de HER2 que comprende un resto de metionina oxidado en Met-254 de SEC ID N°: 16.

7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además una variante de glucosilación del anticuerpo de la especie principal de anticuerpo HER2, en donde la variante de glucosilación se selecciona del grupo que consiste en (i) la especie principal de anticuerpo de HER2 que comprende una estructura de oligosacáridos G1 o G2 unida a una región Fc del mismo;

- 40 (ii) la especie principal de anticuerpo de HER2 que comprende un resto de carbohidrato unido a una cadena ligera del mismo;
 45 (iii) la especie principal de anticuerpo de HER2 que comprende una cadena pesada no glucosilada; y
 (iv) la especie principal de anticuerpo de HER2 con una estructura de oligosacárido sialidado unida a una región Fc del mismo.

8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la especie principal de anticuerpo de HER2 se une al punto de unión entre los dominios I, II y III de HER2.

9. Un anticuerpo que comprende:

- 55 (a) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada como SEC ID N°: 23, o una variante desamidada y/u oxidada de la misma; y
 (b) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada como SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 24 o una variante desamidada y/u oxidada de la misma.

60 10. Una formulación farmacéutica que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o el anticuerpo de la reivindicación 9 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, para uso en un método para tratar cáncer que expresa HER2 en un paciente, que comprende administrar la formulación farmacéutica al paciente en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

65

12. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o del anticuerpo de la reivindicación 9, en la preparación de un medicamento para tratar cáncer que expresa HER2.

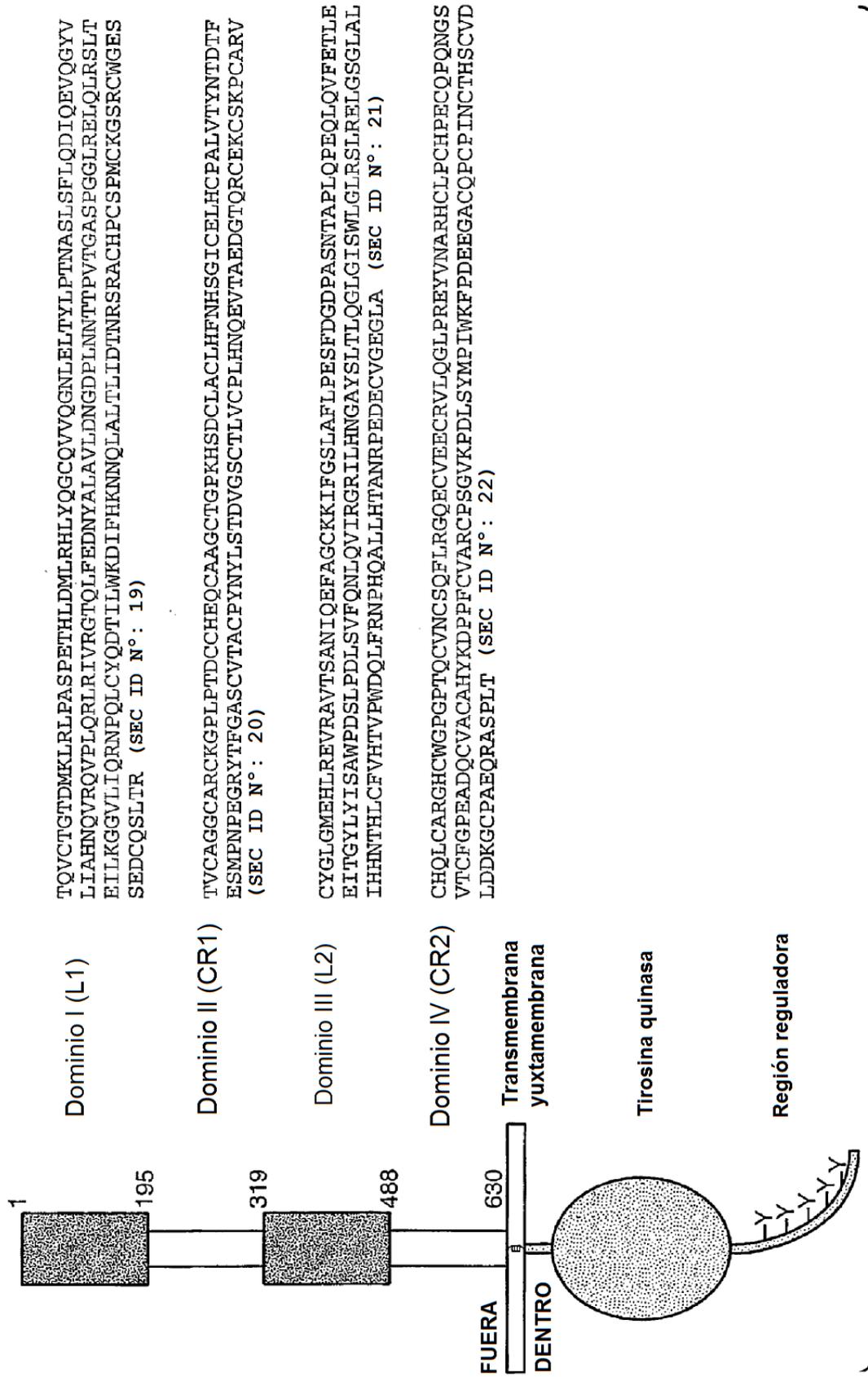


FIG.-1

VARIABLE LIGERA

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQR	
	** **** *	*		*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQK	
		* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQK	
	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTTISSVQA		
	** *	* *	*	**
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP		
	* *****			
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP		
	90	100		
2C4	EDLAVYYC [QQYIYPYT]	FGGGTKLEIK (SEC ID N°: 1)		
	* *	* *		
574	EDFATYYC [QQYIYPYT]	FGQGTKVEIK (SEC ID N°: 3)		
	*** *			
hum κI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK (SEC ID N°: 5)		

FIG._2A

VARIABLE PESADA

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** ** * * *** *		*	*
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		** * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSSGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	* * **	*** *	**** *	
574	PGKGLEWVA [DVNPNSSGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	***** * * * * *	* * *		
SEC ID N°:I	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL		
	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEC ID N°:2)	
	*** **		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEC ID N°:4)	

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS (SEC ID N°:6)	

FIG._2B

Secuencia de aminoácidos para cadena ligera de pertuzumab

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
|      |      |      |      |      |      |
70     80     90     100    110    120
|     |     |     |     |     |     |
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
|     |     |     |     |     |     |
130    140    150    160    170    180
|    |    |    |    |    |    |
SDEQLKSGTASVVCLLNLFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLT
|    |    |    |    |    |    |
190    200    210
|    |    |
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

FIG._3A

Secuencia de aminoácidos para cadena pesada de pertuzumab

```

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

```

FIG._3B

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S 45
 46 Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F 90
 91 T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F 135
 136 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E 180
 181 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T 225
 226 K S F N R G E C (SEC ID N°: 17) 233

FIG. 4A

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G 45
46 F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S 90
91 V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T 135
136 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N 180
181 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S L G T Q T Y I C N V N H 225
226 K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D 270
271 T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E 315
316 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A 360
361 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N 405
406 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R R W Q Q G N V F S C S V M H 450
451 E A L H N H Y T Q K S L S P G (SEC ID N°: 18)

FIG.. 4B

EGFR activado por ligando heterodimeriza con HER2 2C4 se une en el sitio de unión heterodimérico

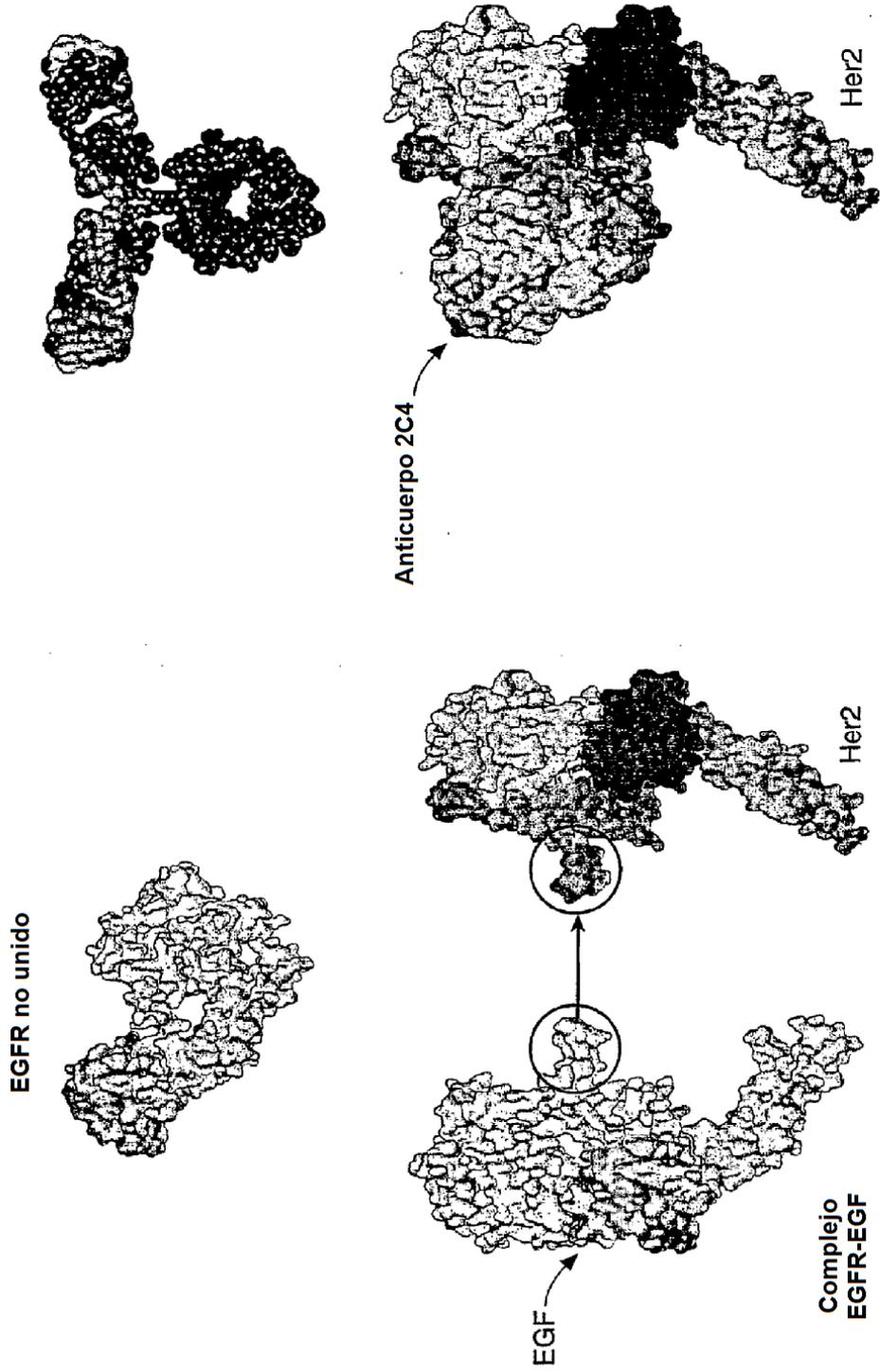


FIG._5

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

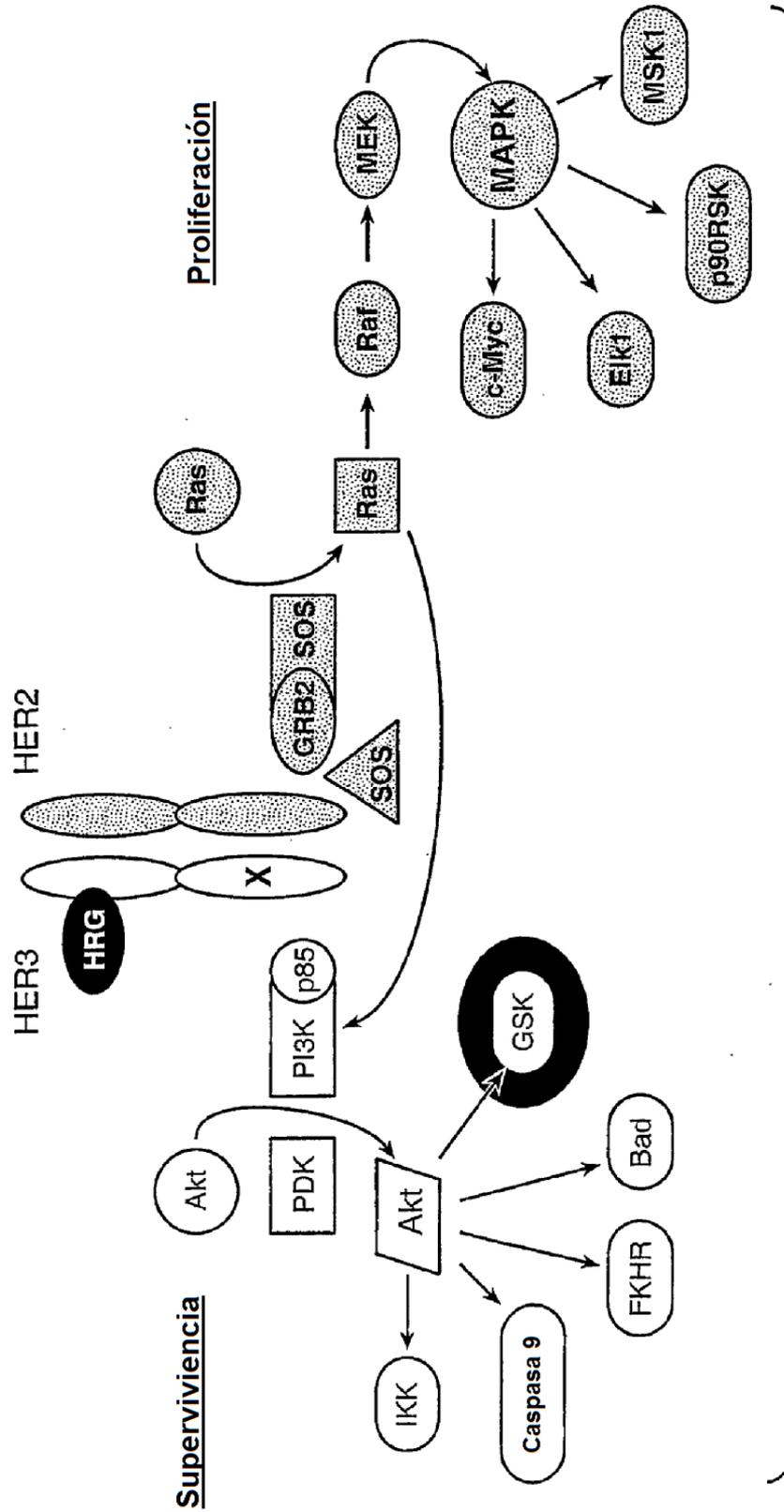
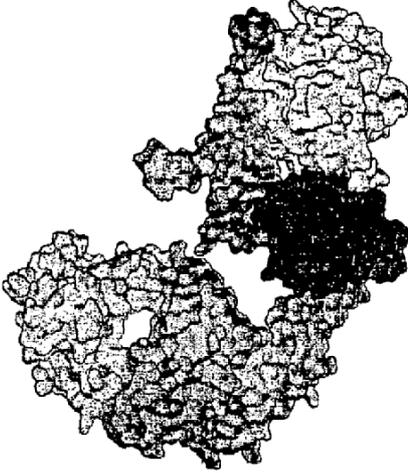
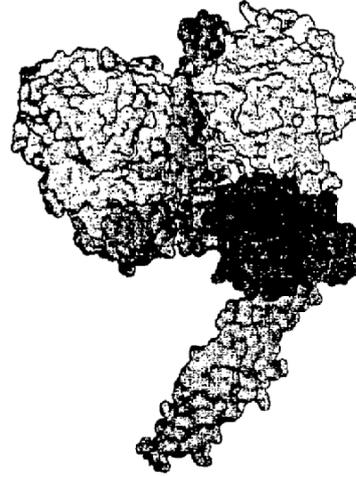


FIG._6

**Trastuzumab
Herceptin**



**Pertuzumab
Omnitarg**



- Se une en IV cerca de JM.
- Protege contra el desprendimiento del receptor
- Afecta moderadamente a la modulación negativa del receptor
- Efecto ligero en el papel de HER2 como un correceptor

- Se une en II en la interfase de dimerización
- No evita el desprendimiento del receptor
- Afecta moderadamente a la modulación negativa del receptor
- Efecto importante en el papel de HER2 como un correceptor

FIG._7

Espectros de masas reconstruidos de pertuzumab reducido: cadena ligera

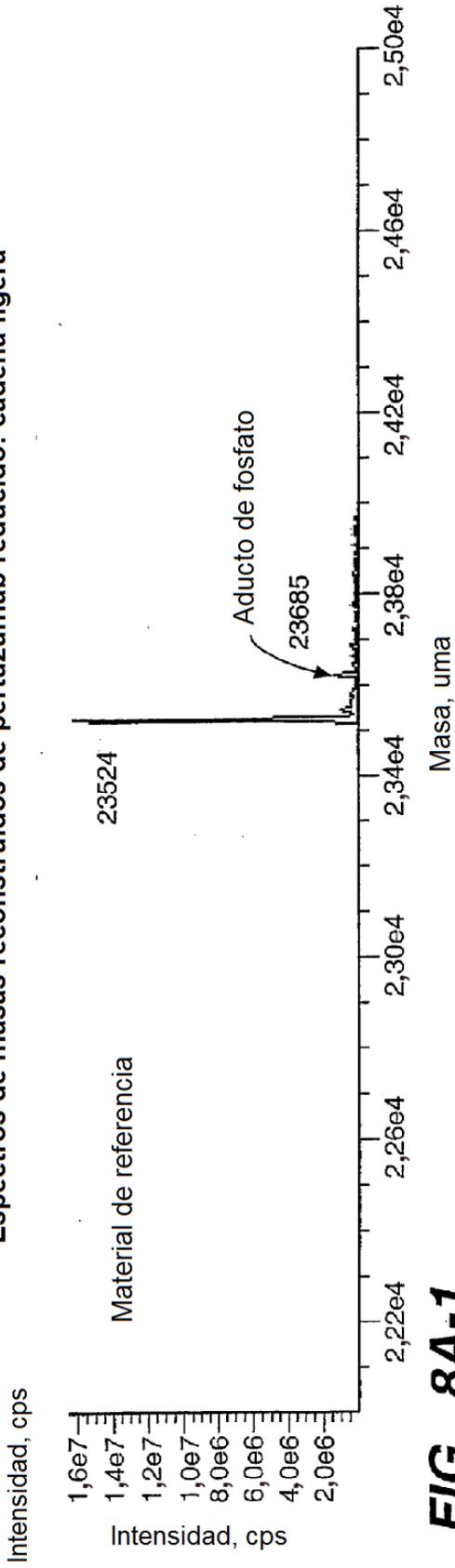


FIG._8A-1

Espectros de masas reconstruidos de pertuzumab reducido: cadena ligera

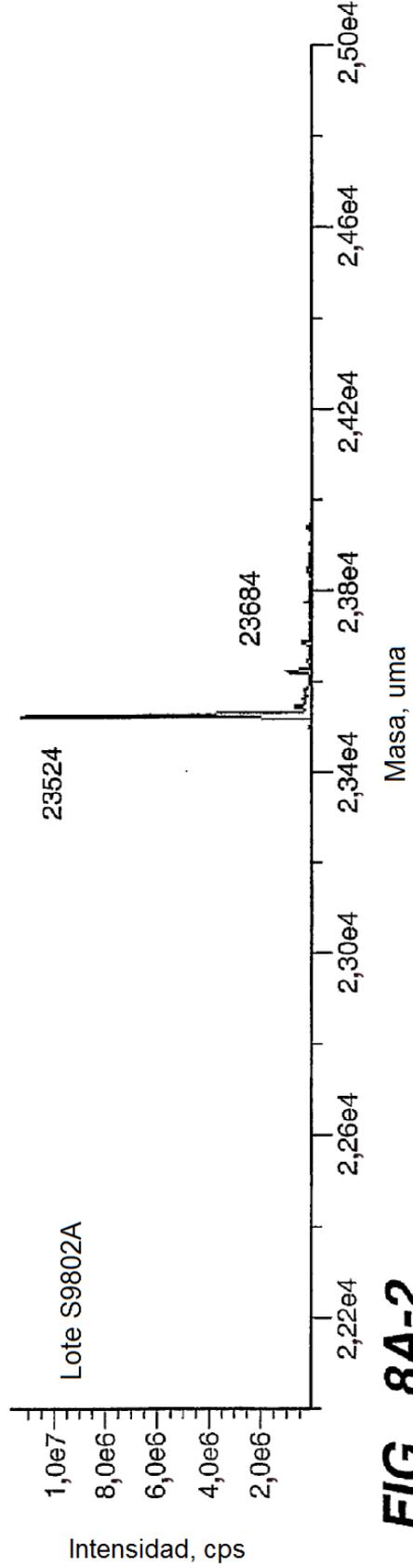


FIG._8A-2

Espectros de masas reconstruidos de pertuzumab reducido: cadena ligera

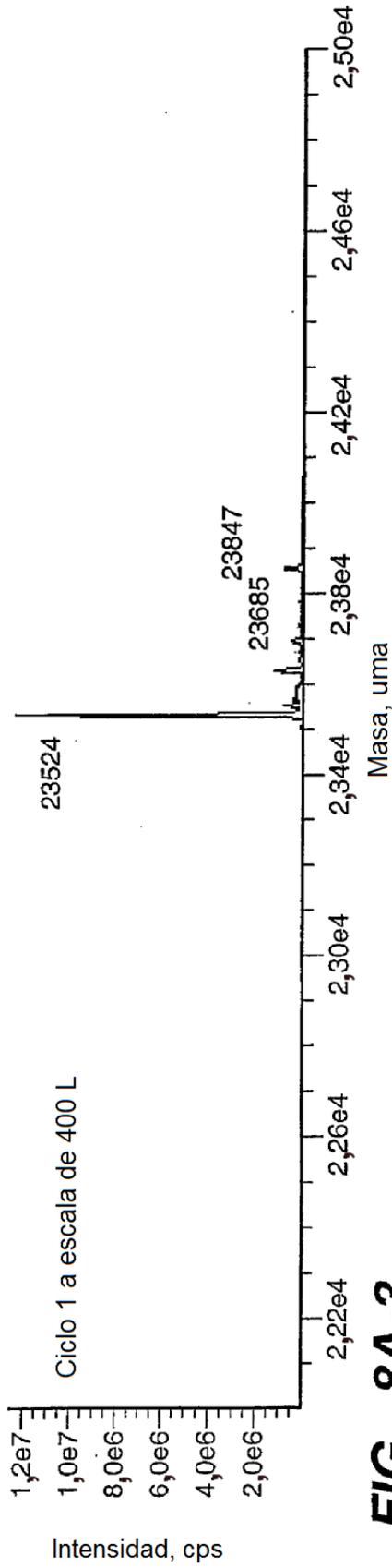


FIG._8A-3

Espectros de masas reconstruidos de pertuzumab reducido: cadena pesada

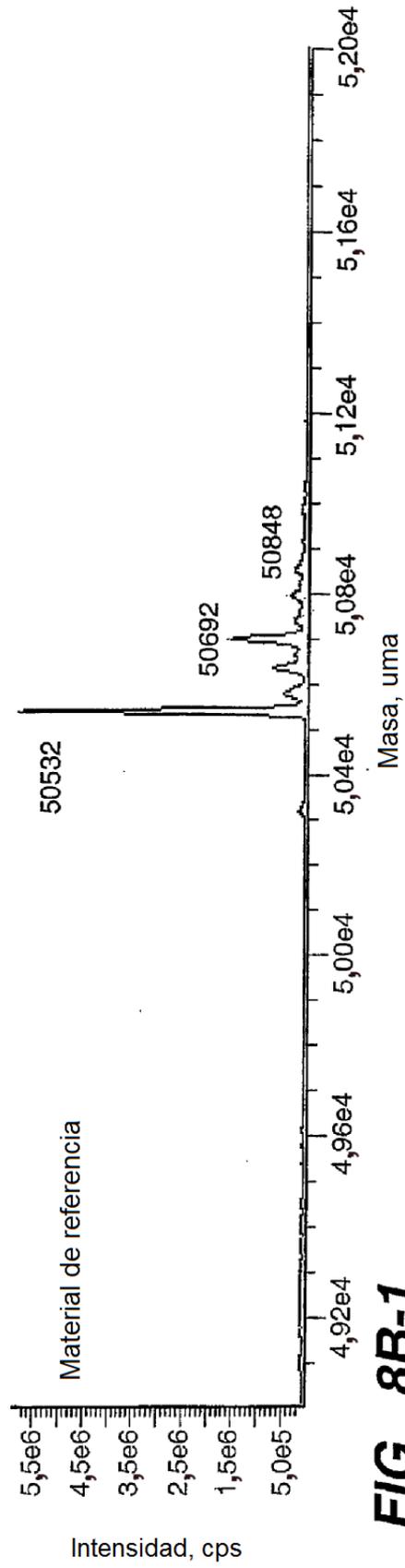


FIG._8B-1

Espectros de masas reconstruidos de pertuzumab reducido: cadena pesada

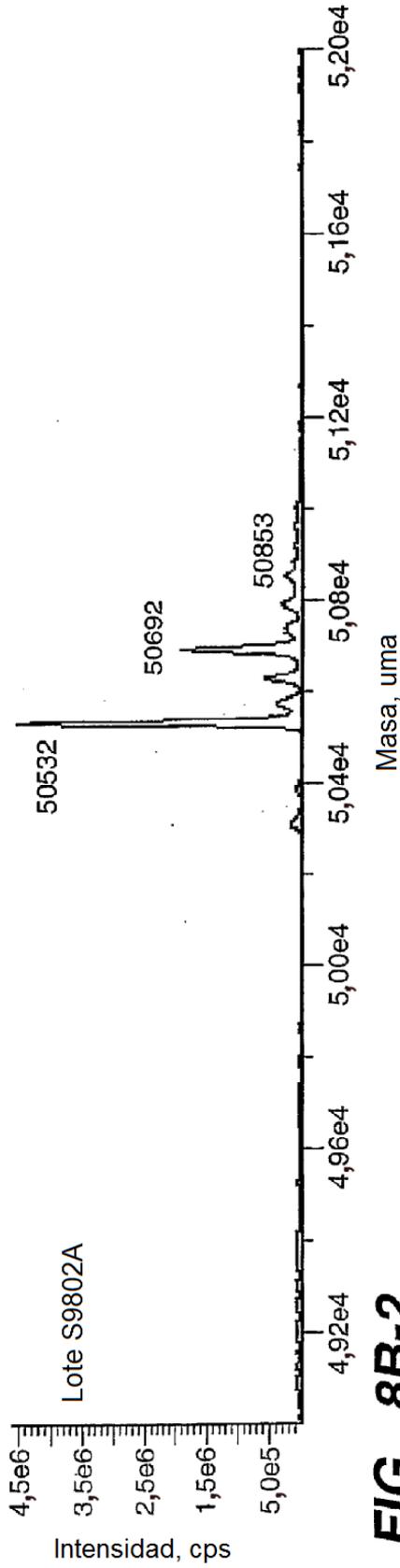


FIG._8B-2

Espectros de masas reconstruidos de pertuzumab reducido: cadena pesada

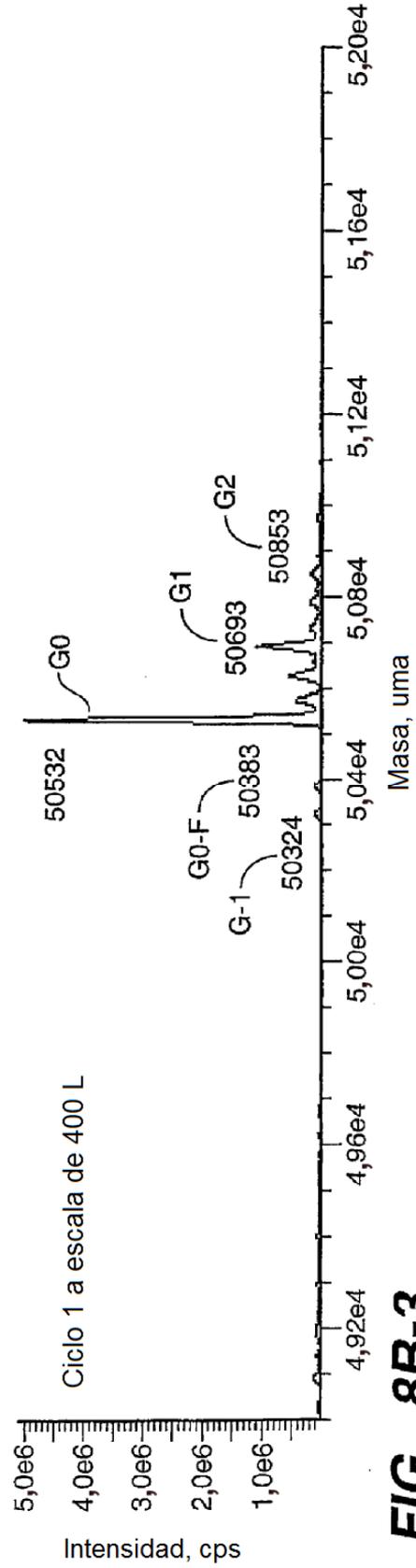


FIG._8B-3

Análisis de cromatografía de intercambio catiónico de pertuzumab nativo

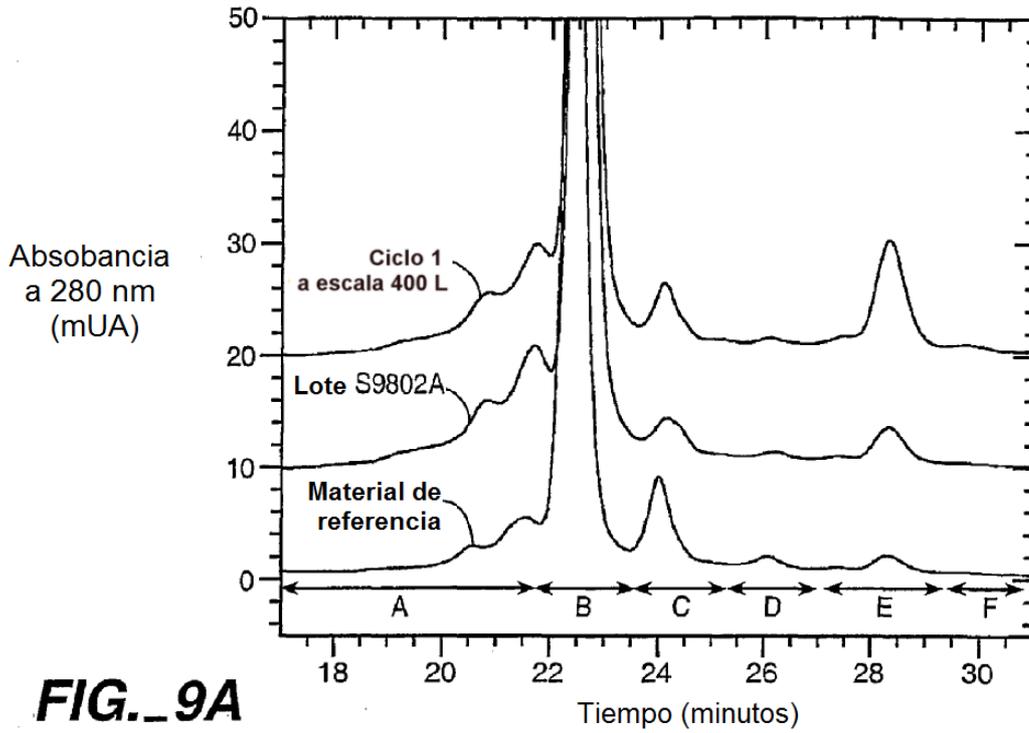


FIG._9A

Análisis de cromatografía de intercambio catiónico de pertuzumab digerido con CPB

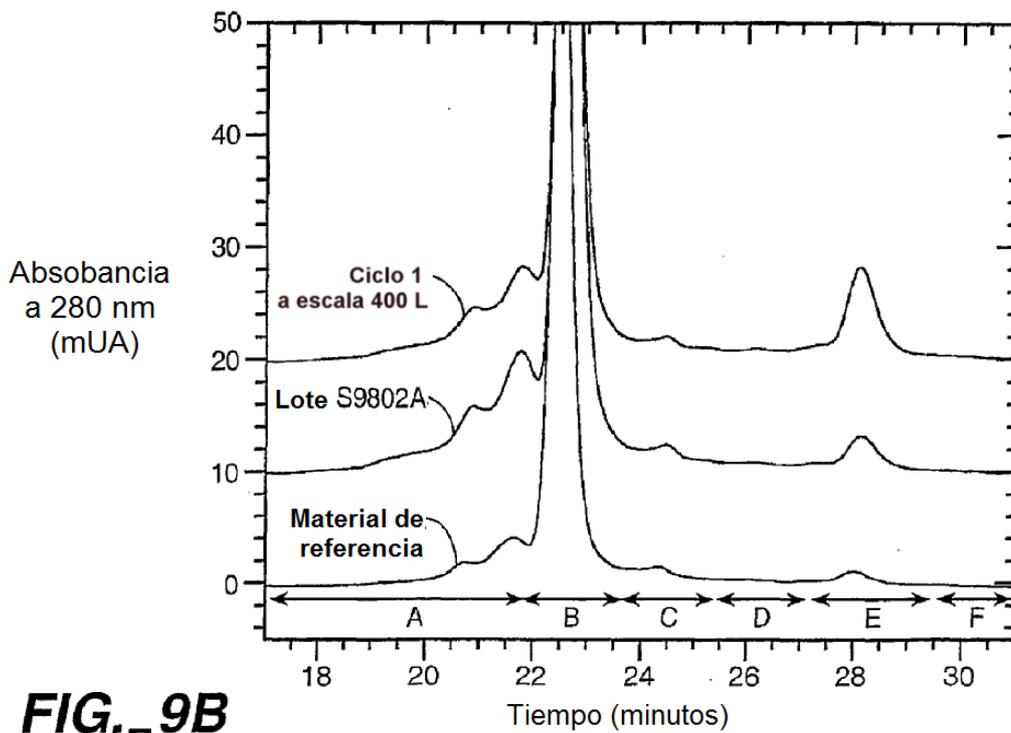


FIG._9B

Análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de pertuzumab

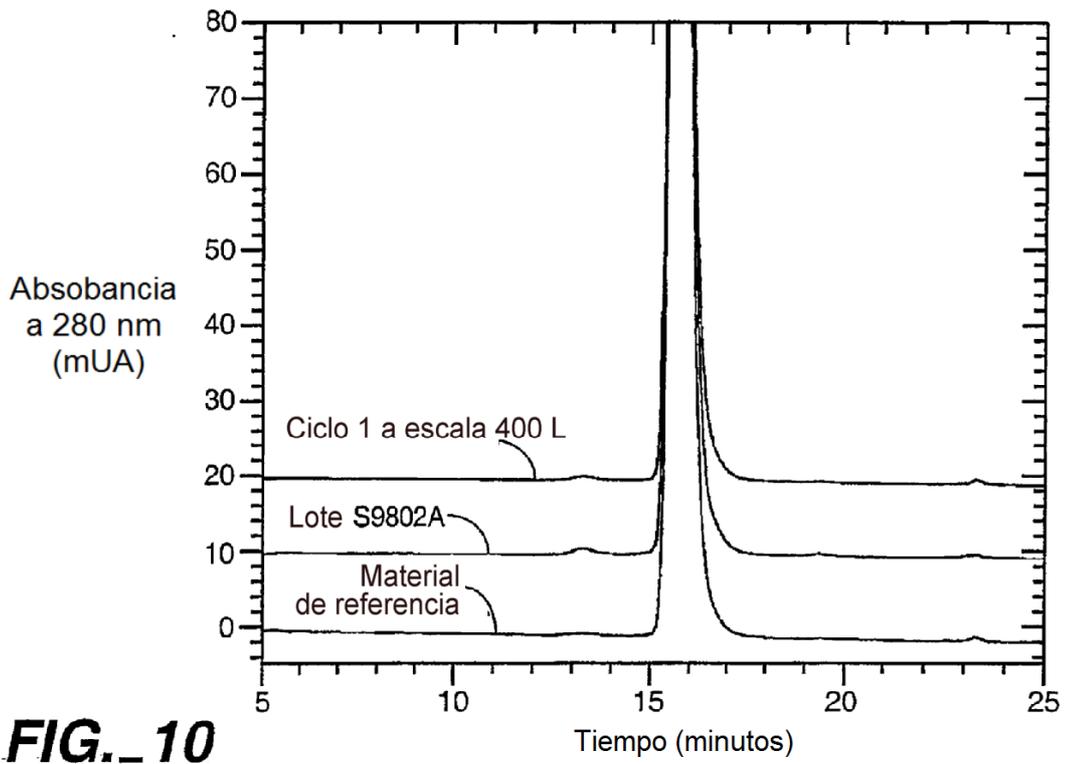
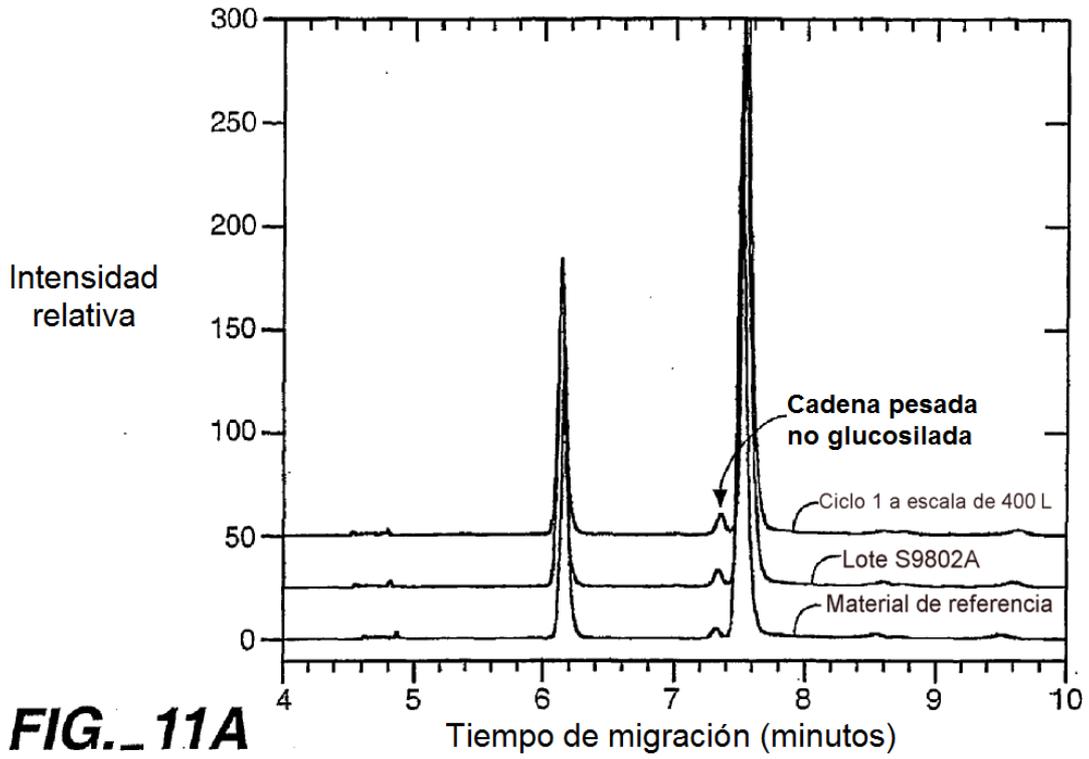
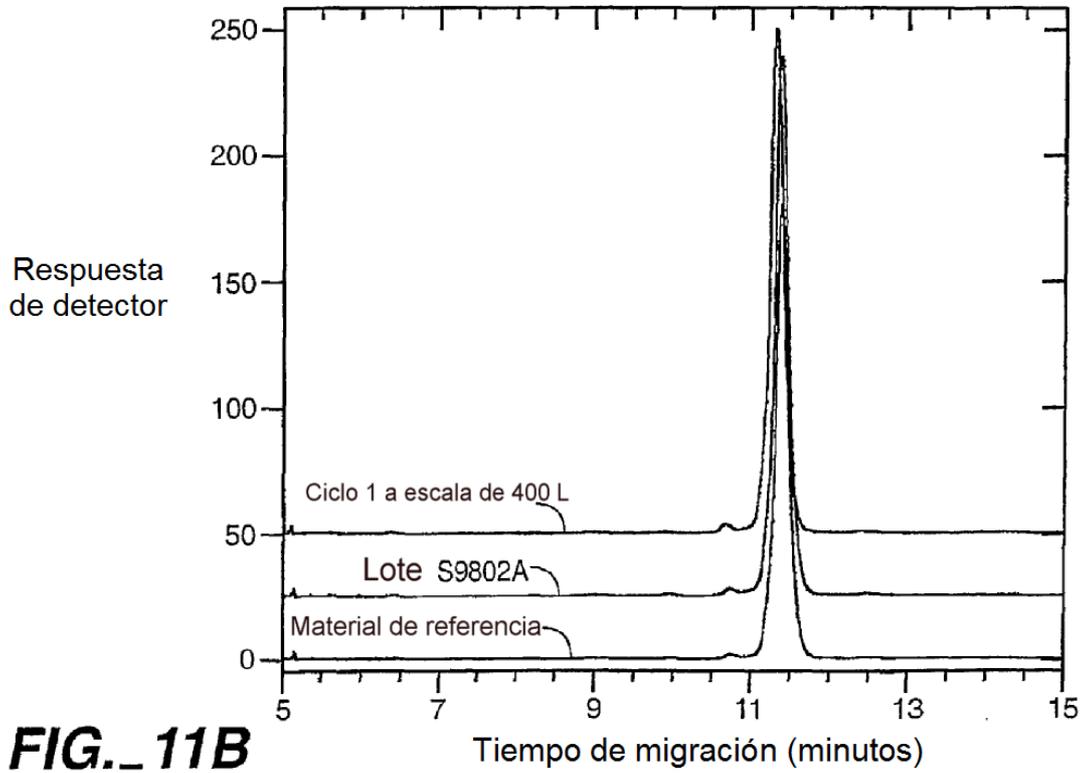


FIG. 10

Análisis de CE-SDS-LIF de pertuzumab reducido



Análisis de CE-SDS-LIF de pertuzumab intacto



Mapas peptídicos tripticos de pertuzumab

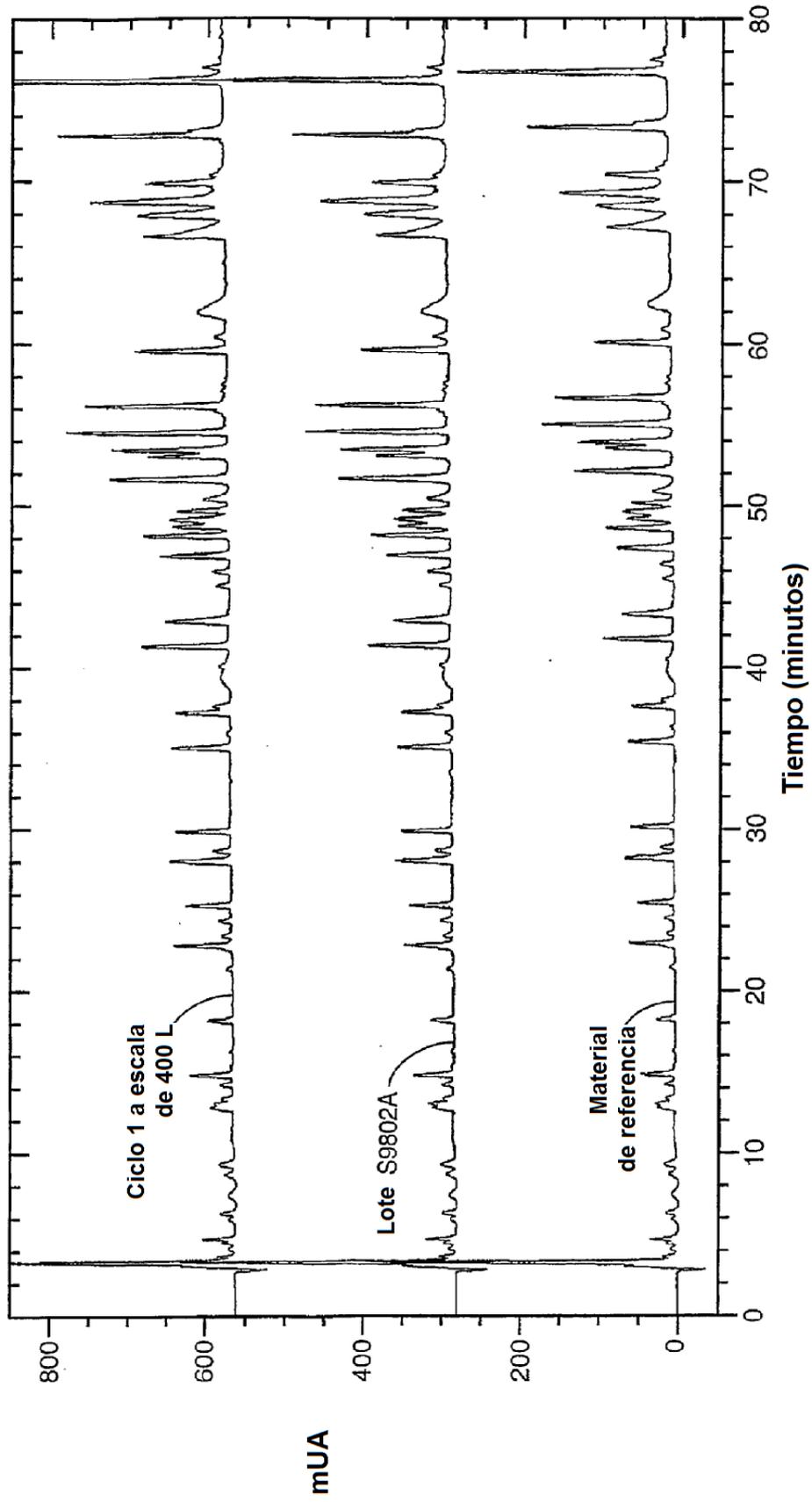


FIG.- 12A

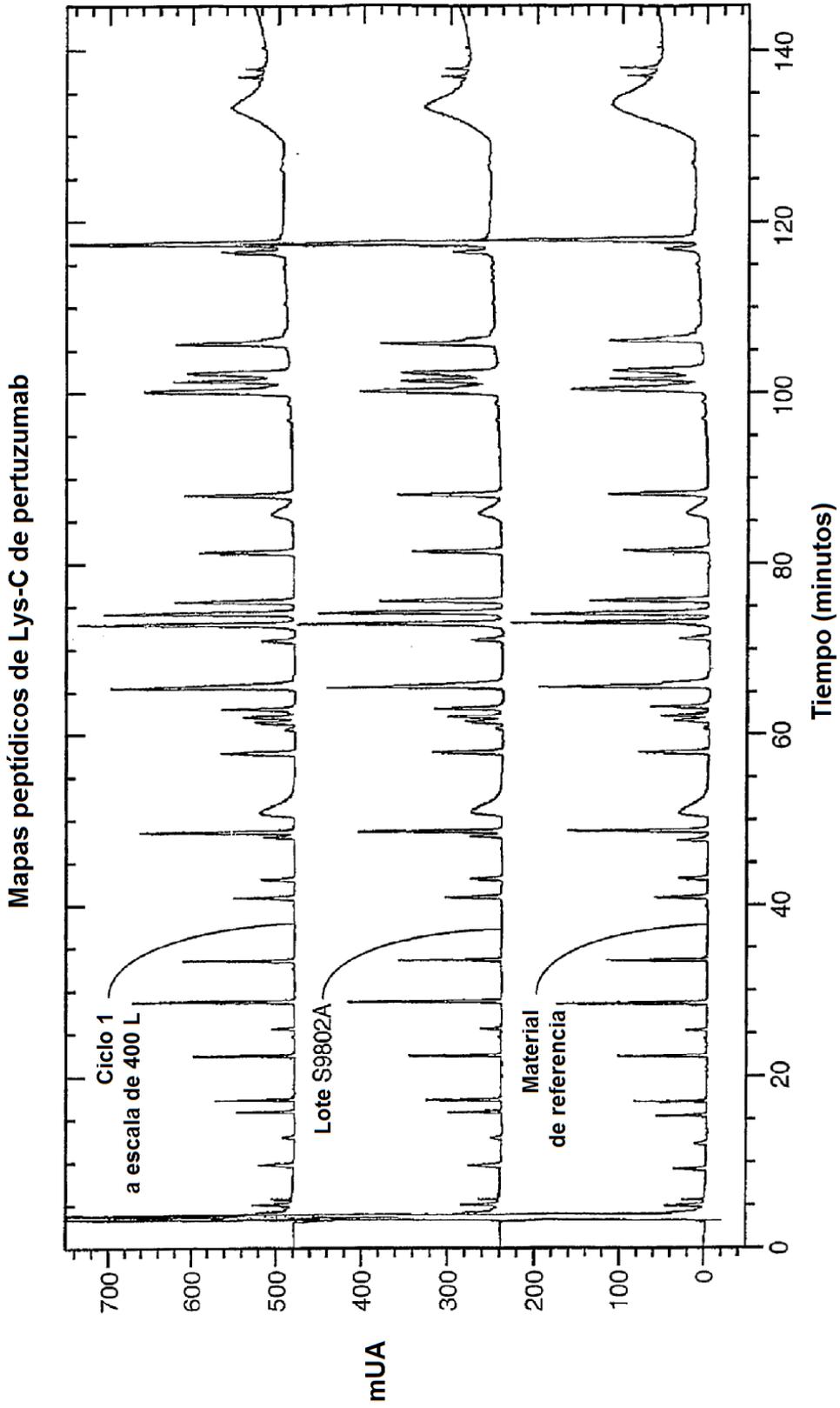


FIG.- 12B

Análisis de CE de oligosacáridos ligados a N liberados de pertuzumab
Trazos superpuestos: alineados

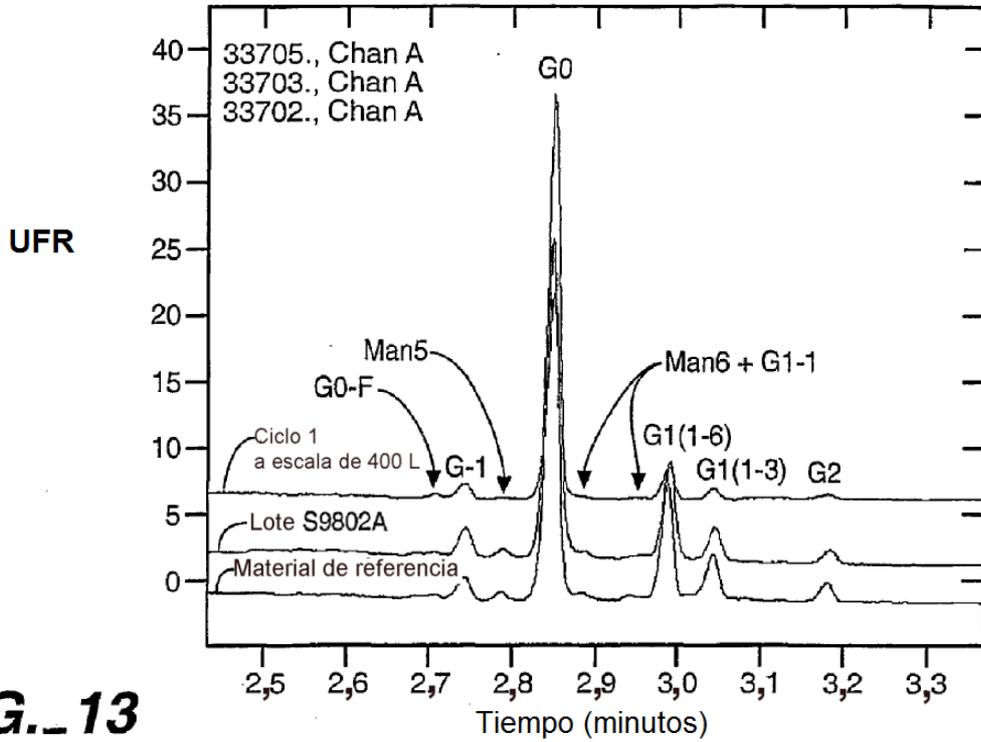


FIG. 13

Espectros de masas MALDI-TOF en modo positivo
de oligosacáridos neutros liberados de pertuzumab

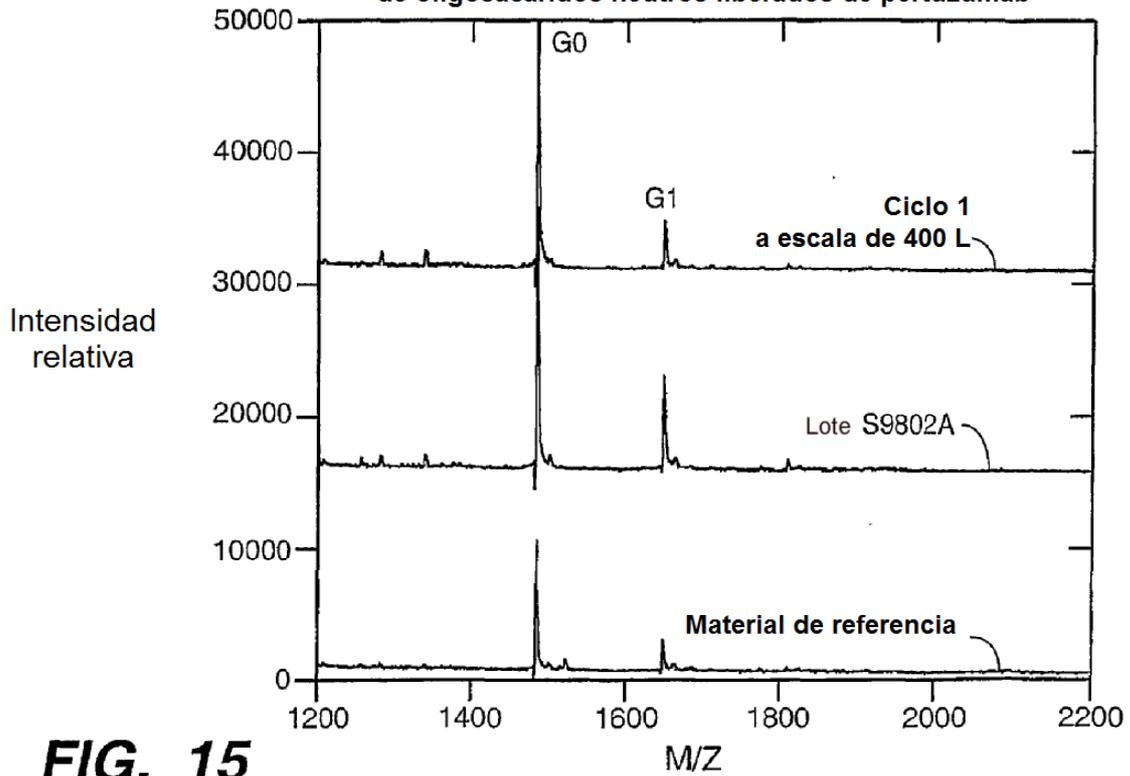


FIG. 15

FIG._14A

Estructuras de oligosacáridos observadas habitualmente en anticuerpos IgG

<u>Estructuras</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Masa</u>
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$	Man5	1235
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G-1	1260
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$	G0-F	1317
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$	Man6	1398

Estructuras de oligosacáridos observadas habitualmente en anticuerpos IgG

<u>Estructuras</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Masa</u>
$\begin{array}{c} \text{Fuca}(1 \rightarrow 6) \\ \\ \text{Gal}\beta(1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 2) \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1 \rightarrow 6) \\ \text{Man}\alpha(1 \rightarrow 3) \end{array} \right\} \text{Man}\beta(1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}- \end{array}$	G1-1	1423
$\begin{array}{c} \text{Fuca}(1 \rightarrow 6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1 \rightarrow 6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1 \rightarrow 3) \end{array} \text{Man}\beta(1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}-$	G0	1463
$\begin{array}{c} \text{Fuca}(1 \rightarrow 6) \\ \\ \text{Gal}\beta(1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1 \rightarrow 6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1 \rightarrow 3) \end{array} \text{Man}\beta(1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}-$	G1 (1-6)	1626
$\begin{array}{c} \text{Fuca}(1 \rightarrow 6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1 \rightarrow 6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1 \rightarrow 3) \end{array} \text{Man}\beta(1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}-$	G1 (1-3)	1626
$\begin{array}{c} \text{Fuca}(1 \rightarrow 6) \\ \\ \text{Gal}\beta(1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1 \rightarrow 6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1 \rightarrow 3) \end{array} \text{Man}\beta(1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}-$	G2	1788

Las masas mostradas en esta figura se corresponden con los valores de (M+Na)⁺.

FIG._ 14B

CADENA LGERA

1 15 30 45
 D I Q M T Q S P S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K
 46 60 75 90
 L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 91 105 120 135
 H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
 136 150 165 180
 L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T
 181 195 210 214
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

FIG.- 16A

CADENA PESADA

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRRQAPGKGL 30 45
 46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AED 75 90
 91 TAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSSVFFLAPSS 120 135
 136 KSTSGGTAALGCLVKDYFPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSS 165 180
 181 GLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDK 210 225
 226 THTCPPAPPELLGGPSSVFLFPPKPKD TLMISRTPPEVTCVV DVS 255 270
 271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY \bar{N} S T YRVS VLT V LHQD 300 315
 316 WLN GK EYKCKVSNKALPAPIEK T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E 345 360
 361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG 390 405
 406 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHHTQKSLSLSPG 435 449

FIG. 16B

1 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K 45
 46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R R F S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y 90
 91 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V 135
 136 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S 180
 181 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K . S F N R G E C 217 (SEC ID N°: 23)

FIG.-17A

1 EVQLVESGGGLVQPFGGLRRLSCLASGFTFTDYTMDDWVRRQAPGGKL 45
46 EWVADVNPNSGGSIYNQRFFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSSLRAED 90
91 TAVYCARNLGPFYFYFDYWGQGLVTVSSASATKGPSSVFFPLAPSSK 135
136 STSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSSG 180
181 LYSLSVVTVPSSSLGTTQTYICNVNHKPSNTKKVDKKVEPKSCDKT 225
226 HTCPFPAPPELLGGPSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDSH 270
271 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSITYRVSVLTLHQDW 315
316 LNGKKEYKCKVSNKALPAPIEKTITISKAKGQPRPEPQVYTLPPSREEM 360
361 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS 405
406 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFFSCSVMHHAALHNHYTQKSSLSPGK 449

(SEC ID N°: 24)

FIG. 17B