

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 929**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2009 E 09760430 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2365987**

54 Título: **Anticuerpos anti-HER4 específicos de isoforma**

30 Prioridad:

25.11.2008 US 117903 P

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

13.02.2015

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (50.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US y
UNIVERSITY OF TURKU (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SLIWKOWSKI, MARK X.;
ELENIUS, KLAUS y
HOLLMEN, MAIJA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 528 929 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

Anticuerpos anti-HER4 específicos de isoforma

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos útiles para detectar y tratar cáncer y a procedimientos de uso de aquellos anticuerpos.

10 Antecedentes de la invención

Los receptores ErbB/HER forman una subfamilia de tirosina cinasas de receptor que incluye EGFR (también conocido como ErbB1 o HER1), HER2 (c-Ncu, ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4). Los receptores ErbB son activados selectivamente por varios factores de crecimiento similares a EGF que conducen a respuestas celulares, tales como proliferación, diferenciación, migración o supervivencia celular. Los receptores ErbB consisten en un dominio extracelular glucosilado, un único dominio transmembrana y un dominio intracelular que incluye una enzima tirosina cinasa. La unión del ligando al dominio extracelular del receptor produce la dimerización del receptor, posterior activación del dominio de cinasa, autofosforilación del receptor y múltiples cascadas de señalización aguas abajo (1).

EGFR y HER2 son oncogenes bien establecidos y dianas de fármaco para el cáncer. Participan en la patogénesis de diversos tumores malignos epiteliales y neurales, y su actividad en exceso está asociada a mal desenlace del paciente (2-4). Los terapéuticos elegidos como diana que incluyen tanto anticuerpos monoclonales como inhibidores de cinasas de peso molecular pequeño que bloquean las funciones de estos receptores han mostrado efecto terapéutico sobre la supervivencia del paciente en ensayos clínicos. Cetuximab (ERBITUX™, Imclone, Inc.) es un anticuerpo monoclonal quimérico que bloquea la unión del ligando a EGFR, conduciendo a una disminución en la dimerización del receptor, autofosforilación y activación de rutas de señalización (5). Cetuximab está actualmente autorizado para uso clínico en cáncer colorrectal quimiorresistente en estadio tardío y carcinoma de células escamosas localmente o regionalmente avanzado de la cabeza y el cuello. Trastuzumab (HERCEPTIN™, Genentech, Inc.) es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el dominio extracelular de HER2 actualmente usado para el tratamiento de cánceres de mama que expresan en exceso ErbB2 en tanto entorno adyuvante como para enfermedad avanzada (6-9).

Se ha mostrado que los antagonistas de receptores de HER4 son útiles en controlar la excesiva migración y/o proliferación de células de músculo liso y, en particular, para el tratamiento de estenosis. Véase la patente de Estados Unidos nº 7.332.579.

La significancia de HER4 en cáncer es poco entendida. Algunas observaciones indican que el receptor HER4 se regula por disminución en diversos cánceres, o que su expresión está asociada a marcadores de pronóstico favorables, tales como la expresión de receptores de estrógenos (10, 11). Por otra parte, se ha informado que HER4 tiene altos niveles de expresión en varios cánceres tales como cáncer de tiroides (12), de ovario (13) y de mama (14), además de meduloblastoma (15) y ependimoma (16). Además, la significancia de los niveles de expresión de HER4 para el desenlace clínico está en conflicto (17). Una de las explicaciones plausibles para estos datos contradictorios es que se generan cuatro isoformas estructuralmente y funcionalmente diferentes a partir de un gen HER4 por corte y empalme alternativo (18, 19). Estas isoformas tienen diferentes perfiles de distribución en tejido y se diferencian en su capacidad para promover la tumorigénesis en líneas de células de cáncer de mama (26).

Por consiguiente, se desea proporcionar un terapéutico que se refiera a isoformas específicas del receptor HER4 para tratar más trastornos mediados por HER4.

Resumen de la invención

Un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo anti-HER4 aislado que se une específicamente a la isoforma JM-a de HER4, en el que el anticuerpo compite para unirse a la isoforma JM-a con el anticuerpo anti-HER4 el mAb 1479 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC que tiene nº de acceso PTA-9655. En otra realización, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal mAb 1479 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC que tiene nº de acceso PTA-9655. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.

En otra realización, el anticuerpo anti-HER4 aislado que se une específicamente a la isoforma JM-a de HER-4 comprende un fragmento del anticuerpo monoclonal mAb 1479 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC que tiene nº de acceso PTA-9655 que se une específicamente a la isoforma JM-a de HER-4. En una realización, el fragmento comprende la región variable de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal mAb 1479. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo está madurado por afinidad. En una realización, el anticuerpo anti-HER4 aislado comprende el anticuerpo monoclonal mAb 1479 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC

que tiene nº de acceso PTA-9655 o forma humanizada del mismo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-HER4 aislado está ligado a un agente citotóxico.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-HER4 aislado que se une específicamente a la isoforma JM-a de HER-4 tiene menos cardiotoxicidad que un anticuerpo anti-HER4 que no es específico para la isoforma JM-a de HER-4.

10 Otro aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento de inhibición de la proliferación de una célula cancerosa que expresa la isoforma JM-a de HER-4, que comprende poner en contacto la célula cancerosa con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-HER4 que se une específicamente a la isoforma JM-a de HER-4. En una realización, el anticuerpo anti-HER4 reduce la diseminación del ectodominio de HER4. En algunas realizaciones, la célula cancerosa es una célula de cáncer de mama, cáncer de ovario o meduloblastoma.

15 Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer en un paciente cuyo cáncer expresa la isoforma JM-a de HER-4 que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-HER4 que se une específicamente a la isoforma JM-a de HER-4.

20 El cáncer que va a tratarse es cáncer de mama.

El procedimiento puede comprender seleccionar un paciente cuyas células cancerosas expresan la isoforma JM-a de HER-4 y administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-HER4 como se reivindica que se une específicamente a la isoforma JM-a de HER-4. En una realización, el anticuerpo anti-HER4 reduce HER4 la diseminación del ectodominio.

25 Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento de detección de la presencia del ectodominio de HER4 diseminado en una muestra de células que comprende poner en contacto las células con un anticuerpo que se une específicamente a la isoforma JM-a de HER4 como se reivindica.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un diagrama que muestra las isoformas de HER4 del dominio yuxtamembrana alternativo JM-a (SEC ID Nº: 1) y JM-b (SEC ID Nº: 2).

35 La Figura 2 es una tabla que describe características de ciertos anticuerpos monoclonales para HER4.

La Figura 3 es un análisis de transferencia Western que representa la especificidad de unión del mAb 1479 y un anticuerpo de control, sc-283, por células COS-7 que expresan las isoformas de HER4 JM-a CYT-2 o JM-b CYT-1.

40 La Figura 4 es un análisis de transferencia Western que representa la especificidad de unión del mAb 1479 y anticuerpos de control anti-EGFR (sc-03), anti-HER2 (sc-284), anti-HER3 (sc-285) por células NIH 3T3-7d y NR6 que expresan establemente diferentes receptores ErbB.

45 La Figura 5 es una gráfica que muestra la especificidad de unión del mAb 1479 por transfectantes NIH 3T3-7d y NR6 que expresan HER4 JM-a CYT-2, HER4 JM-b CYT-1, EGFR, HER2 o HER3 como se analiza por una enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) celular (columnas grises). Se comparó la unión del mAb 1479 a la unión de anti-EGFR (sc-03), anti-HER2 (sc-284), anti-HER3 (sc-285) y anti-HER4 (sc-283) (unión de todos los anticuerpos de control en columnas blancas) en diluciones 1:1000 (izquierda) o 1:100 (derecha).

50 La Figura 6 es un análisis de transferencia Western que muestra la unión del mAb 1479 al ectodominio de HER4 diseminado en lisado de tejido de riñón humano y al ectodominio de HER4 recombinante.

55 La Figura 7 muestra los resultados de un ensayo de unión *in vitro* llevado a cabo con un ectodominio de HER4 recombinante y mAb 1479.

La Figura 8 es una curva de afinidad no lineal de un enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) que mide el mAb 1479 que se une al ectodominio de HER4 recombinante.

60 La Figura 9 es un análisis de transferencia Western de 17 muestras emparejadas de tejido de mama normal (N)/ tumor de mama (T) usando el mAb 1479 para detectar la diseminación del ectodominio. La cuantificación densitométrica de los niveles de expresión del ectodominio de HER4 de 100 kDa (gris) y HER4 de longitud completa de 150 kDa (blanco) se muestran debajo de cada carril de western.

65 La Figura 10 es una gráfica que muestra la expresión media del ectodominio de HER4 y receptor de longitud completa en los 17 pares emparejados de tejido normal y de tumor de mama cuantificados por densitometría. *,

la fracción de HER4 total presente como ectodominio fue mayor dentro de tejidos tumorales, cuando se comparó con los controles emparejados de tejido normal (recuadros grises; $P < 0,05$; prueba del orden con signo de Wilcoxon).

La Figura 11A es un análisis de transferencia Western que muestran el efecto del mAb 1479 sobre la fosforilación de tirosina de HER4 de células MCF-7 estimuladas con NRG-1 de cáncer de mama. La membrana se volvió a transferir con anti-HER4 (Abcam) y anti-actina como controles. La Figura 11B es un análisis de transferencia Western que muestran el efecto del mAb 1479 sobre la diseminación del ectodominio de HER4 de 100 kDa en el medio de cultivo de transfectantes de COS-7 que expresan JM-a CYT-2 de HER4. Se analizaron lisados celulares totales del mismo experimento por transferencia Western con anti-HER4 (Abcam) y anti-actina.

La Figura 12 es un análisis de transferencia Western que muestra el efecto del mAb 1479 sobre la ubiquitinación de isoformas JM-a escindibles de HER4.

La Figura 13 es un análisis de transferencia Western que muestra el efecto del mAb 1479 sobre los niveles de expresión de HER4.

La Figura 14 es una gráfica que muestra el efecto del mAb 1479 sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama humano T-47D y MCF-7 en comparación con el anticuerpo de control 2C4.

La Figura 15 es una gráfica que muestra el efecto del mAb 1479 sobre el crecimiento independiente del anclaje de líneas celulares de cáncer de mama humano T-47D y MCF-7 en comparación con el anticuerpo de control 3g6 como se indica por un ensayo de formación de colonias sobre agar blando.

Descripción detallada

DEFINICIONES

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención, y están de acuerdo con: Singleton y col. 1994 Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2ª ed., J. Wiley & Sons, New York, NY; y Janeway y col. 2001 Immunobiology: the immune system in health and disease. 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York.

El término "polipéptido de HER4" o "receptor HER4", como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específicamente o contextualmente de otro modo, a cualquier polipéptido nativo o de variante que se produzca a partir de un gen HER4 desvelado, por ejemplo, en la solicitud de patente europea nº (EP)599.274; Plowman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993); y Plowman y col., Nature, 366:473-475 (1993). En una realización, el gen HER4 es un gen HER4 humano. Los términos "HER4" y "ErbB4" se usan indistintamente en la materia. El término engloba formas que se producen naturalmente, formas de variantes que se producen naturalmente (por ejemplo, formas alternativamente cortadas y empalmadas), variantes alélicas que se producen naturalmente y puede incluir modificaciones post-traduccionales que se producen naturalmente tales como glucosilación y modificaciones de GPI.

El término "natural" se refiere generalmente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína HER4 que se produce naturalmente.

Un "polipéptido de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido correspondiente derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido de secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente del polipéptido específico (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas de variantes que se producen naturalmente (por ejemplo, formas alternativamente cortadas y empalmadas), variantes alélicas que se producen naturalmente del polipéptido y puede incluir modificaciones postraduccionales que se producen naturalmente tales como glucosilación, etc.

El término "variante de la secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptido que se producen naturalmente que tiene una secuencia de aminoácidos que se diferencia hasta cierto punto del polipéptido de secuencia nativa predominante. Las variantes de la secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos.

"Identidad de secuencias" se define como el porcentaje de residuos en la variante de la secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias. Procedimientos y programas informáticos para el alineamiento son muy conocidos en la técnica. Un programa informático tal es "Align 2", escrito por Genentech, Inc., que se presentó con

documentación de usuario en la United States Copyright Office, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991, y cuyo código se encuentra en el documento WO 2007/001851.

El "dominio extracelular" o "ECD" se refiere a una forma del polipéptido que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplásmicos. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado por los polipéptidos de la presente invención se identifica conforme a criterios rutinariamente empleados en la materia para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Pueden variar los límites exactos de un dominio transmembrana, pero lo más probablemente no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio como se ha identificado inicialmente en el presente documento.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio, y específicamente cubre anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada (Miller y col. 2003 Jour. of Immunology 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos, o derivarse de otras especies. Un anticuerpo es una proteína que puede reconocer y unirse a un antígeno específico (Janeway y col. 2001 Immunobiology: the immune system in health and disease, 5^a Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana generalmente tiene numerosos sitios de unión, también llamados epítopes, reconocidos por CDR sobre múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítope diferente tiene una estructura diferente. Así, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de una diana de interés o parte del mismo, incluyendo tales dianas, pero no se limitan a, célula o células cancerosas que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados a una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina desvelada en el presente documento puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden derivarse de cualquier especie tal como humana, murina o conejo. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véanse Basic & Clinical Immunology, 8^a edición, Stites y Terr (eds.), McGraw-Hill, Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994 en el Capítulo 6.

Los "anticuerpos nativos" son glucoproteínas normalmente heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas (de las que hay dos tipos llamados kappa y lambda) y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está ligada a 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 también tiene puentes de disulfuro entre cadenas regularmente separadas. 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 residuos de aminoácidos particulares forman una superficie de separación entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

Un "anticuerpo parental" puede comprender una secuencia nativa o natural. Un anticuerpo parental puede estar dirigido contra un antígeno diana de interés, por ejemplo, un polipéptido biológicamente importante. También se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos de no polipéptido (tales como antígenos de glucolípido asociados a tumor; véase el documento US 5091178).

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

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión o variable del antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; minicuerpos (documento US 5641870, Ejemplo 2; Zapata y col. 1995 Protein Eng. 8(10): 1057-1062); Olafsen y col. 2004 Protein Eng. Design & Sel. 17(4):315-323), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión a epítope de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos de célula de cáncer, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término “anticuerpo monoclonal”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores y diferencias en la glucosilación. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminar por otros anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col. 1975 Nature 256: 495, o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véanse, por ejemplo: los documentos US 4816567; US 5807715). En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se ha descrito anteriormente para provocar linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y a continuación se fusionan con una línea celular de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding 1986 Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 Academic Press). Los anticuerpos también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en Clackson y col. 1991 Nature 352:624-628; Marks y col. 1991 J. Mol. Biol. 222:581-597.

El ADN que codifica el anticuerpo puede modificarse para producir “polipéptidos de anticuerpos quiméricos o de fusión”, por ejemplo, sustituyendo las secuencias del dominio constante de la cadena pesada y de la cadena ligera humanas (C_H y C_L) con secuencias murinas homólogas (documento US 4816567; y Morrison y col. 1984 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851), o fusionando la secuencia codificante de la inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias de polipéptido de no inmunoglobulina pueden sustituirse con los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen con 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 con el antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación con el antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

Los anticuerpos en el presente documento específicamente incluyen anticuerpos “quiméricos” en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es (son) idéntica(s) a u homóloga(s) a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presentan la actividad biológica deseada (documento US 4816567; y Morrison y col. 1984 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden las secuencias de unión al antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio superior, etc.) y secuencias de la región constante humanas.

Formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los residuos de una región hipervariable del receptor están sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseada. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento de anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, correspondiéndose todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables con aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulinas humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. El fragmento Fc comprende las porciones del extremo carboxi de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc, región que también es la parte reconocida por receptores Fc (FcR) encontrados sobre ciertos tipos de células (Jones y col. 1986 Nature 321:522-525; Riechmann y col. 1988 Nature 332:323-329; Presta 1992 Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596; Verhoeyen y col. 1988 Science 239:1534-1536; Sims y col. 1993 J. Immunol. 151:2296; Chotia y col. 1987 J. Mol. Biol. 196:901). Otros procedimientos usan una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas (Carter y col. 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta y col. 1993 J. Immunol. 151:2623).

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o ha sido producido usando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos como se ha desvelado en el presente documento. Están disponibles animales transgénicos

(por ejemplo, ratones) que pueden, tras la inmunización, producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal produce inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en tales ratones mutantes de la línea germinal producirá la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno (Jakobovits y col. 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551; Jakobovits y col. 1993 Nature, 362:255-258; Bruggemann y col. 1993 Year in Immuno. 7:33; documentos US 5545806; US 5569825; US 5591669; US 5545807; y WO 1997/17852.

Un anticuerpo "manipulado con cisteína" es cuando uno o más aminoácidos de cualquier forma de anticuerpo monoclonal parental murino natural, anticuerpo humano o humanizado se sustituyen con un aminoácido de cisteína. El aminoácido de cisteína manipulado es un ácido de cisteína libre y no parte de una unidad de disulfuro intracadena o intercadena. El ADN que codifica uno o más residuos de aminoácidos del anticuerpo de interés se modifica o "manipula" de forma que se introducen uno o más codones para un aminoácido de cisteína y así está disponible cisteína libre sobre el anticuerpo expresado para la modificación adicional tal como una conjugación con un fármaco citotóxico.

Un "antígeno" es un polipéptido predeterminado, hidrato de carbono, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto que se produce naturalmente o sintético al que puede unirse selectivamente un anticuerpo. La membrana celular de una célula puede presentar un "antígeno expuesto en la superficie celular".

Un anticuerpo "se une" a una diana molecular o un antígeno de interés cuando la unión a ese antígeno es con afinidad y especificidad suficientes de manera que se forme un complejo de anticuerpo-antígeno que es útil en elegir como diana los epítopes del antígeno. Los epítopes del antígeno pueden exponerse sobre la superficie de células o pueden estar presentes sobre una proteína aislada.

El término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico por" una diana molecular particular o un antígeno de interés o un epítope sobre un diana molecular particular o un antígeno de interés significa la unión que es mediblemente diferente de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse por competición con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana marcada a una sonda se inhibe competitivamente por diana no marcada en exceso. En una realización, tales términos se refieren a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido o epítope particular sobre un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítope de polipéptido. Alternativamente, tales términos pueden describirse por una molécula que tiene una Kd para la diana de al menos aproximadamente 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, o mayor.

"Afinidad de unión" se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su componente de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1 : 1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su componente Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por procedimientos comunes conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conocen en la técnica varios procedimientos de medición de la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente invención.

Un "complejo de anticuerpo-antígeno" o un "complejo de conjugado de anticuerpo-fármaco-antígeno" se forma como resultado de unión específica. Por ejemplo, si el anticuerpo es uno que se une a HER4 específicamente, o una isoforma de HER4 específicamente, normalmente se unirá preferencialmente a uno o más epítopes encontrados sobre HER4 nativo, o isoforma del mismo, y puede ser un anticuerpo que no tiene afinidad de unión significativa (por ejemplo, afinidad de unión no específica o reactividad cruzada) con otros antígenos o proteínas u otras isoformas de HER4. En tales realizaciones, el grado de afinidad de unión no específica o unión reactiva a no HER4, u otras isoformas de HER4, será inferior al 10 %, 5 %, 2 % o 1 %, como se ha determinado por análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA).

Un "anticuerpo intacto" en el presente documento es uno que comprende dominios V_L y V_H , además de un dominio constante de la cadena ligera (CL) y dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de la secuencia nativa humana) o variante de la secuencia de aminoácidos de la misma. El anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras" que se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región constante Fc (una región Fc de la secuencia nativa o variante de la región Fc de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo.

Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; y regulación por disminución de receptores de la superficie celular tales como el receptor de linfocitos B y BCR.

5 El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables se diferencien ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usen en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables tanto en los dominios variables de las cadenas ligeras como las cadenas pesadas. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman las regiones estructurales (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan ampliamente una configuración de hoja β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de hoja β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de anticuerpos (véase Kabat y col. 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

20 El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en V_H (H1, H2, H3) y tres en V_L (L1, L2, L3). Están en uso varias delineaciones de región hipervariable y están englobadas en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencias y son las más comúnmente usadas (Kabat y col. 1991). Chotia se refiere en su lugar a la localización de los bucles estructurales (Chotia y Lesk 1987 *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se indican más adelante. A menos que se indique de otro modo, se empleará la numeración de Kabat según la base de datos de Kabat de secuencias de proteínas alineadas (Wu y Kaba 1970 *J. Exp. Med.* 132:211-250; Johnson y Wu 2000 *Nuc. Acids Res.* 28(1):214-218). Las localizaciones de la región hipervariable o "regiones determinantes de la complementariedad" son generalmente las siguientes: aminoácidos 24-34 (V_L CDR-L1), aminoácidos 49-56 (V_L CDR-L2), aminoácidos 89-97 (V_L CDR-L3), aminoácidos 26-35A (V_H CDR-H1), aminoácidos 49-65 (V_H CDR-H2) y aminoácidos 93-102 (V_H CDR-H3). Las regiones hipervariables también pueden comprender "regiones hipervariables extendidas", aminoácidos 24-36 para V_L CDR-L1 y aminoácidos 46-56 para V_L CDR-L2. Los residuos del dominio variable están numerados según Kabat y col. 1991, arriba, para cada una de estas definiciones. Una "región hipervariable alterada", para los fines en el presente documento, es una región hipervariable que comprende uno o más (por ejemplo, una a aproximadamente 16) sustitución (sustituciones) de aminoácidos(s) en ellas. Una "región hipervariable no modificada", para los fines en el presente documento, es una región hipervariable que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo no humano del que se derivó, es decir, uno que carece de una o más sustituciones de aminoácidos en él.

Los términos "numeración de residuos del dominio variable como en Kabat", "numeración de la posición de aminoácidos como en Kabat", y variaciones de los mismos, se refieren al sistema de numeración usado para los dominios variables de la cadena pesada o dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat y col. 1991, arriba). Usando este sistema de numeración, la actual secuencia de aminoácidos lineal puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un inserto de un único aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 e insertarse residuos (por ejemplo, los residuos 82a, 82b, y 82c, etc. según Kabat) después del residuo 82 de la FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de residuos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

Residuos de la "región estructural" o de "FR" son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se han definido en el presente documento. Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa el residuo de aminoácidos que se produce más comúnmente en una selección de secuencias de la región estructural V_L o V_H de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de V_L o V_H de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias del dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat y col. 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD). En una realización, para V_L , el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat y col. 1991. En una realización, para V_H , el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat y col. Una "región estructural consenso del subgrupo III de V_H " comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III pesado variable de Kabat y col. 1991. Una "región estructural consenso del subgrupo I de V_L " comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa ligero variable de Kabat y col. 1991.

65

Un anticuerpo “madurado por afinidad” es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que producen una mejora en la afinidad del anticuerpo por antígeno, en comparación con un anticuerpo que no posee aquella(s) alteración (alteraciones). Los anticuerpos madurados por afinidad tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante maduración por afinidad por barajado de dominios V_H y V_L (Marks y col. 1992 *Bio/Technology* 10:779-783), o mutagénesis al azar de residuos de CDR y/o de regiones estructurales (Barbas y col. 1994 *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813; Schier y col. 1995 *Gene* 169:147-155; Yelton y col. 1995 *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson y col. 1995 *J. Immunol.* 154(7):3310-9; y Hawkins y col. 1992 *J. Mol. Biol.* 226:889-896).

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

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' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluyen 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 (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes poseen un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

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.

Fragmentos “Fv monocatenarios” o “scFv” de anticuerpos comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena de polipéptidos sencilla. El polipéptido de Fv comprende además un conector de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno (Plückthun 1994 *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315).

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que comprenden un V_H conectado a un V_L en la misma cadena de polipéptidos (V_H-V_L). Usando un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son obligados a emparejarse con los dominios complementarios de la otra cadena y a crear dos sitios de unión al antígeno (documentos EP 404.097; WO 1993/11161; Hollinger y col. 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448).

El término “conjugado de anticuerpo-fármaco”, o “inmunoconjugados” comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Un “aminoácido de cisteína libre” se refiere a un residuo de aminoácido de cisteína que se ha manipulado en un anticuerpo parental, tiene un grupo funcional tiol (-SH), y no está emparejado como, o es de otro modo parte de, un puente de disulfuro intramolecular o intermolecular.

El término “valor de reactividad del tiol” es una caracterización cuantitativa de la reactividad de aminoácidos de cisteína libres. El valor de reactividad del tiol es el porcentaje de un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo manipulado con cisteína que reacciona con un reactivo reactivo con tiol, y se convierte en un valor máximo de 1. Por ejemplo, un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo manipulado con cisteína que reacciona con el 100 % de rendimiento con un reactivo reactivo con tiol, tal como un reactivo de biotina-maleimida, formará un anticuerpo marcado con biotina que tiene un valor de reactividad del tiol de 1,0. Otro aminoácido de cisteína manipulado en el mismo anticuerpo parental o diferente que reacciona con el 80 % de rendimiento con un reactivo reactivo con tiol tendrá un valor de reactividad del tiol de 0,8. Otro aminoácido de cisteína manipulado en el mismo anticuerpo parental o diferente que deja totalmente de reaccionar con un reactivo reactivo con tiol tiene un valor de reactividad del tiol de 0. La determinación del valor de reactividad del tiol de una cisteína particular puede realizarse por ensayo de ELISA, espectroscopía de masas, cromatografía de líquidos, autorradiografía u otras pruebas analíticas cuantitativas. Los reactivos reactivos con tiol que permiten la captura del anticuerpo manipulado con cisteína y la comparación y cuantificación de la reactividad de la cisteína incluyen biotina-PEO-maleimida ((+)-biotinil-3-maleimidopropionamidil-3,6-dioxaoctainodiamina, Oda y col. (2001) *Nature Biotechnology* 19:379-382, Pierce

Biotechnology, Inc.), biotina-BMCC, PEO-yodoacetil-biotina, yodoacetil-LC-biotina y biotina-HPDP (Pierce Biotechnology, Inc.) y N α -(3-maleimidilpropionil)biotina (MPB, Molecular Probes, Eugene, OR). Otras fuentes comerciales para la biotilación, reactivos de conector bifuncionales y multifuncionales incluyen Molecular Probes, Eugene, OR, y Sigma, St. Louis, MO.

Un anticuerpo o un conjugado de anticuerpo-fármaco se "internaliza" cuando, después de formar un complejo con un antígeno de la superficie celular, el complejo de antígeno-anticuerpo o el complejo de antígeno-conjugado de anticuerpo-fármaco presente sobre la membrana de la superficie celular se elimina de la superficie de la célula y se incorpora en la propia célula mediante una reacción bioquímica. Varias rutas de tráfico post-endocíticas posibles pueden ensamblar después el complejo (véanse las revisiones Schroeder y col. 2001 "Recent advances in membrane microdomains: rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking". *Exp Biol. Med* (Maywood) Nov; 226(10):873-90), Spooner y col 2006 "Retrograde transport pathways utilized by viruses and protein toxins" *Virology* 2006; 3: 26). Los anticuerpos preparados contra la proteína desnaturalizada serían útiles en transferencias Western, pero no se esperaría que se unieran a epítopes de la superficie celular ni formarían complejos de antígeno-anticuerpo y así no se internalizarían.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" significan un receptor que se une a la región constante Fc de un anticuerpo. Además, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, que incluyen variantes alélicas y formas alternativamente cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activante") y Fc γ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. El receptor activante Fc γ RIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase la revisión Daeron 1997 *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet 1991 *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92; Capel y col. 1994 *Immunomethods* 4:25-34; y de Haas y col. 1995 *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41. Otros FcR, que incluyen aquellos que van a identificarse en el futuro, están englobados por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col. 1976 *J. Immunol.* 117:587 y Kim y col. 1994 *J. Immunol.* 24:249).

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta del complemento clásica se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno relacionado (Gazzano-Santoro y col. 1996 *J. Immunol. Methods* 202:163).

"Citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por célula en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos espontáneos (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente producen la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan Fc γ RIII solo, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet 1991 *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en los documentos US 5500362 y US 5821337. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos espontáneos (NK). Alternativamente, 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 y col. 1998 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95:652-656.

"Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más receptores de la región constante (FcR) y realizan funciones efectoras. Las células expresan al menos Fc γ RIII y realizan función efectora de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP), linfocitos citolíticos espontáneos (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o CMSP.

"Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refieren tanto a tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas, en el que el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) la afección o trastorno patológico elegido como diana. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno, además de aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los cuales va a prevenirse el trastorno. Un sujeto o mamífero es "tratado" satisfactoriamente para un cáncer si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo, o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo, según los procedimientos de la presente invención, el paciente muestra reducción observable y/o medible en, o ausencia de, uno o más de los siguientes: reducción en el número de células cancerosas o ausencia de células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentizar hasta cierto grado o detener) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos que incluyen la diseminación del cáncer en tejido blando y hueso; inhibición de la metástasis tumoral; inhibición del crecimiento tumoral; y/o alivio hasta cierto grado de uno o más de los síntomas asociados al cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas, y mejora en cuestiones de la calidad de vida. Hasta el punto de que el anticuerpo, o conjugado

de anticuerpo-fármaco del mismo, pueda prevenir el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Los parámetros para evaluar el tratamiento satisfactorio y la mejora en la enfermedad son fácilmente medibles por procedimientos rutinarios familiares para un médico. Para terapia del cáncer, la eficacia puede medirse, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR). Las metástasis pueden determinarse por pruebas de estadificación y por barridos óseos y pruebas para el nivel de calcio y otras enzimas para determinar la diseminación al hueso. También pueden hacerse TAC para buscar la diseminación a la pelvis y ganglios linfáticos en el área. La radiografía del tórax y la medición de los niveles de enzimas en el hígado mediante procedimientos conocidos se usan para buscar metástasis a los pulmones e hígado, respectivamente. Otros procedimientos rutinarios para monitorizar la enfermedad incluyen ultrasonografía transrectal (TRUS) y biopsia transrectal con aguja (TRNB).

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Un “tumor” comprende una o más células cancerosas, y se refiere a todo el crecimiento y proliferación celular neoplásico, tanto maligno como benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de colon, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (“CPCNP”), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer de cabeza y cuello, y melanoma.

Un cáncer que “expresa en exceso” un polipéptido es uno que tiene niveles significativamente mayores del polipéptido en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Tal expresión en exceso puede producirse por un aumento de la transcripción o traducción, que a su vez puede haber sido producido por anomalías o cambios en el nivel genético (por ejemplo, mutaciones o alteraciones de ADN), variaciones de corte y empalme de ARNm, o alteraciones en la actividad de factores de transcripción genética particulares, promotores o potenciadores. La expresión en exceso puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando el aumento de niveles de la proteína receptora presentes sobre la superficie de una célula (por ejemplo, por un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). Alternativamente o adicionalmente pueden medirse niveles de ácido nucleico que codifica receptor en la célula, por ejemplo, por hibridación *in situ* fluorescente (FISH; véase el documento WO 1998/45479), transferencia Southern o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa en tiempo real con transcriptasa inversa (qRT-PCR).

Los términos “trastorno proliferativo de células” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que están asociados a algún grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo de células es cáncer.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto grado o detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto grado uno o más de los síntomas asociados al cáncer. Hasta el punto de que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes puede ser citostático y/o citotóxico. El término “citostático” se refiere al efecto de limitar la función de células, tal como limitar el crecimiento celular o proliferación de células. Por ejemplo, en la terapia contra el cáncer, la eficacia puede medirse evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR).

El término “marca” significa cualquier resto que pueda unirse covalentemente a un anticuerpo y que sirve para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con una segunda marca para modificar la señal detectable proporcionada por la primera o segunda marca, por ejemplo, FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia); (iii) estabilizar interacciones o aumentar la afinidad de unión, con antígeno o ligando; (iv) afectar la movilidad, por ejemplo, movilidad electroforética, o permeabilidad celular, por carga, hidrofobia, forma, u otros parámetros físicos, o (v) proporcionar un resto de captura, para modular la afinidad del ligando, unión anticuerpo/antígeno, o complejación iónica.

El término “sal farmacéuticamente aceptable”, como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un ADC. Sales a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, las sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido o tartrato. Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ión acetato, un ión succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabilice la carga sobre el compuesto. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener

más de un átomo cargado en su estructura. Casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

5 “Solvato farmacéuticamente aceptable” se refiere a una asociación de una o más moléculas de disolvente y un ADC. Ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

10 “Vehículos”, como se usa en el presente documento, incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o mamífero que se expone a ellos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Frecuentemente, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada a pH. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS®.

20 COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS

Isoformas de HER4

25 Se generan cuatro isoformas estructuralmente y funcionalmente diferentes a partir de un único gen HER4 por corte y empalme alternativo (18, 19). Dos de las isoformas se diferencian en el dominio citoplásmico intracelular (isoformas CYT-1 y CYT-2). CYT-1 tiene un inserto de 16 aminoácidos dentro del dominio citoplásmico mientras que CYT-2 no tiene inserto (18). La isoforma CYT-1 puede mediar en el acoplamiento a fosfoinositida 3-cinasa (PI3-K), pero no la isoforma CYT-2 (20, 21).

30 Las otras dos isoformas (JM-a y JM-b) se diferencian por una inserción de tanto 23 como 13 aminoácidos alternativos en la región de yuxtamembrana extracelular (Figura 1). JM-a es la isoforma con 23 aminoácidos dentro de la región de yuxtamembrana (NGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHA SEC ID N°: 1), mientras que JM-1b es la isoforma con 13 aminoácidos en esta región (IGSSIEDCIGLMD SEC ID N°: 2) (17, 23).

35 La isoforma extracelular JM-a puede escindirarse por enzima convertora de factor de necrosis tumoral α (TACE) (22), mientras que la isoforma JM-b es resistente a proteínasa (23). La escisión por TACE desencadena una segunda escisión de HER4, que implica actividad de γ -secretasa (24). Como resultado, el dominio intracelular (ICD) se libera de la membrana celular y se transloca al núcleo en el que puede funcionar en la transcripción génica reguladora (25-28).

40 De acuerdo con la hipótesis de que las isoformas de HER4 se diferencian en su función en la tumorigénesis, la isoforma JM-a CYT-2 de HER4 escindible, pero no su homólogo JM-b CYT-2 no escindible, demuestra actividad independiente del ligando y promueve el crecimiento de células del cáncer (26). Además, la localización de un epítipo de HER4 intracelular en los núcleos está asociada a supervivencia más corta cuando se compara con la localización de HER4 en la superficie celular (29), sugiriendo que la escisión de HER4 puede regular la progresión tumoral. Se ha mostrado previamente que estas mismas isoformas escindibles se expresan en exceso en una serie clínica de muestras de pacientes con cáncer de mama (18, 26).

50 Además, las isoformas JM-a y JM-b presentan diferentes patrones de distribución en tejido, además de la isoforma JM-a que está ausente de tejido cardíaco (23).

Anticuerpos específicos de isoforma

55 Un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a la isoforma JM-a de HER4. En una realización, el anticuerpo se une específicamente a tanto el receptor HER4 de longitud completa intacto que comprende la región de yuxtamembrana de JM-a, como también al ectodominio de HER4 soluble. En otra realización, el anticuerpo se une específicamente a una secuencia de aminoácidos que comprende NGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHA SEC ID N°: 1. En otra realización, el anticuerpo se une específicamente a la secuencia de aminoácidos NGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHA (SEC ID N°: 1).

60 Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo anti-HER4 aislado que se une específicamente a la isoforma JM-a de HER-4 en el que el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal mAb 1479 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC que tiene n° de acceso PTA-9655. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o madurado por afinidad derivado del anticuerpo monoclonal mAb 1479 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC que tiene n° de acceso PTA-9655.

65

Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo anti-HER4 que comprende un fragmento del anticuerpo monoclonal mAb 1479 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC que tiene nº de acceso PTA-9655. El anticuerpo es específico para la isoforma JM-a de HER4. El fragmento se une específicamente a la isoforma JM-a de HER-4. En la realización, el fragmento comprende las regiones hipervariables de la cadena ligera y pesada del mAb 1479. El fragmento comprende las tres regiones hipervariables VH1, VH2 o VH3 y las tres regiones hipervariables VL1, VL2 y VL3.

En la realización, el fragmento comprende la región variable ligera y pesada del mAb 1479.

En algunas realizaciones, el fragmento comprende mutaciones que no disminuyen significativamente la especificidad de unión del anticuerpo por la isoforma JM-a.

Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo que compite por unirse a la isoforma JM-a con el anticuerpo anti-HER4 mAb 1479 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC que tiene nº de acceso PTA-9655.

Todavía otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítoto que el epítoto al que se une el anticuerpo monoclonal mAb 1479 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC que tiene nº de acceso PTA-9655.

En una realización, el epítoto unido por el anticuerpo monoclonal mAb 1479 comprende el ectodominio de HER4. En otra realización, el epítoto unido por el anticuerpo monoclonal mAb 1479 comprende al menos una porción de la secuencia de aminoácidos NGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHA (SEC ID N°: 1). En otra realización, el epítoto unido por el anticuerpo monoclonal mAb 1479 comprende la secuencia de aminoácidos NGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHA (SEC ID N°: 1).

En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos para la isoforma JM-a son anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-HER4, que es específico para la isoforma JM-a, reduce la fosforilación de tirosina de HER4. Se ha mostrado que la supresión de la fosforilación de tirosina de receptor se asocia a una actividad antitumoral de anticuerpos terapéuticos que eligen como diana dominios extracelulares de otros receptores ErbB (39, 48, 49). El efecto de un anticuerpo anti-HER4 sobre la fosforilación de HER4 puede determinarse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica, un ejemplo de los cuales se describe en el presente documento en los Ejemplos 1 y 5. Brevemente, las células que expresan HER4 se tratan con un anticuerpo anti-HER4, a continuación se estimulan con NRG-1. Las células se lisan y se inmunoprecipitan con un anticuerpo anti-HER4 general, tal como HFR-1 (R&D, Mineápolis, MN), se separan en geles de SDS-PAGE y se analizan por transferencia Western usando un anticuerpo anti-fosfotirosina, tal como 4G10 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Las transferencias pueden barrerse y analizarse por densitometría de barrido para proporcionar un análisis cuantitativo. En algunas realizaciones se incluye un control. En una realización, un control comprende una muestra de células que expresan HER4 estimuladas con NRG-1 en ausencia de tratamiento con el anticuerpo anti-HER4. Las células se analizan por transferencia Western como sucede con las células tratadas. En una realización, el anticuerpo anti-HER4 reduce la fosforilación de tirosina de HER4 al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-HER4 que es específico para la isoforma JM-a reduce la escisión de HER4. La escisión de HER4 produce la liberación de un fragmento del ectodominio de 100 kDa. Este acontecimiento también se denomina la diseminación del ectodominio. El efecto de un anticuerpo anti-HER4 sobre la escisión de HER4 puede determinarse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica, un ejemplo de los cuales se describe en el presente documento en los Ejemplos 1 y 5. Brevemente, la reducción en la escisión de HER4 puede detectarse determinando la presencia del ectodominio en medios de cultivo celular de células que expresan HER4 tratadas con un anticuerpo anti-HER4. La escisión puede potenciarse incluyendo forbol 13-miristato 12-acetato (PMA) en el ensayo. En algunas realizaciones se incluye un control. En una realización, se incluye un control en el que se determina la presencia del ectodominio en medios de cultivo celular de células que expresan HER4 no tratado con un anticuerpo anti-HER4. En una realización, el anticuerpo anti-HER4 reduce la escisión de HER4 al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-HER4 que es específica para la isoforma JM-a se internaliza. La internalización del anticuerpo puede usarse para administrar toxinas conjugadas con anticuerpo a células cancerosas que expresan la isoforma JM-a de HER4.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-HER4 que es específico para la isoforma JM-a promueve la internalización de HER4. La internalización de tirosina cinasas de receptor se ha asociado a la regulación por disminución de los receptores. En una realización, el anticuerpo anti-HER4 disminuye la cantidad de HER4 sobre la superficie celular al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %. El efecto de un anticuerpo anti-HER4 sobre la internalización de HER4 puede determinarse mediante

procedimientos muy conocidos en la técnica, un ejemplo de los cuales se describe en el presente documento en los Ejemplos 1 y 6.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-HER4 que se une específicamente a la isoforma JM-a de HER4 tiene menos cardiotoxicidad que un anticuerpo anti-HER4 que no es específico para la isoforma JM-a de HER4. La cardiotoxicidad es un efecto secundario asociado a muchos terapéuticos de inhibidores de tirosina cinasas de receptor (62, 63). Se predice que los anticuerpos que son específicos para la isoforma JM-a de HER4 producen menos efectos cardiotoxícos en pacientes que los anticuerpos anti-HER4 que reconocen la isoforma JM-b debido a que la isoforma JM-a no está presente en tejido cardíaco (23). La cardiotoxicidad en un paciente se evidencia por varios síntomas que incluyen insuficiencia cardíaca, disfunción ventricular izquierda (LVD), isquemia miocárdica, hipertensión, tromboembolia venosa, bradicardia y prolongación del intervalo QT (medida del tiempo entre el inicio de la onda Q y el final de la onda T en el ciclo eléctrico del corazón).

La cardiotoxicidad de un compuesto puede medirse, por ejemplo, usando modelos de diagnóstico *in vitro* o *in vivo*.

La determinación *in vitro* de la cardiotoxicidad puede hacerse exponiendo células cardíacas a un compuesto de prueba y observando cualquier cambio en el aspecto de las células o tasa apoptósica de las células. Cambios relevantes en el aspecto de las células incluyen hinchazón y degeneración mitocondrial. La apoptosis celular puede monitorizarse, por ejemplo, por marcado de extremos cortados por desoxiuridina 5-trifosfato mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal. Adicionalmente, el aumento de la secreción de sustancias químicas o enzimas relacionadas con la apoptosis por las células es indicativo de cardiotoxicidad. Tales sustancias químicas o enzimas incluyen troponina, péptidos natriuréticos tales como propéptido del extremo N de tipo B (pro-BNP), citocromo C y caspasa-9. Las células cardíacas que pueden usarse como modelo de células cultivadas incluyen miocitos ventriculares adultos o neonatales primarios o cultivados (cardiomiocitos) obtenidos de un modelo animal adecuado, tal como ratón o rata (62-64).

La determinación *in vivo* de la cardiotoxicidad puede realizarse, por ejemplo, inyectando un compuesto de prueba en un modelo animal adecuado, tal como un ratón o rata, y observando el efecto del compuesto de prueba sobre la estructura del tejido cardíaco del modelo, aspecto cardíaco mitocondrial y función, y/o sobre las tasas de apoptosis del tejido cardíaco del modelo (62). También son útiles modelos de corazón aislado, o preparaciones de Langendorf, para determinar la cardiotoxicidad de compuestos (63).

La cardiotoxicidad también puede medirse por observaciones clínicas. Por ejemplo, se miden insuficiencia cardíaca y LVD por diagnóstico clínico que combina historia del paciente y examen físico con pruebas de diagnóstico tales como electrocardiograma (ECG), radiografía de tórax y ventriculografía isotópica (MUGA), se determina la isquemia miocárdica por examen físico, detección de necrosis miocárdica, detección de cambios en EKG y detección de elevadas elevaciones en enzimas cardíacas. La hipertensión se determina midiendo la tensión arterial de un paciente. Aquellos pacientes con una tensión arterial superior o igual a 140/90 mm Hg se consideran generalmente que tienen hipertensión. La tromboembolia venosa se detecta por ultrasonografía de compresión, angiografía tomográfica, angiografía pulmonar por resonancia magnética, o técnicas de medicina nuclear. La bradicardia se define generalmente como una frecuencia cardíaca inferior a 60 latidos por minuto y se detecta determinando la frecuencia cardíaca combinada con un ECG o análisis de monitor de Holter. La prolongación del intervalo QT es una anomalía de la actividad eléctrica del corazón y puede determinarse por análisis de ECG. En general, un intervalo de QT inferior o igual a 440 milisegundos se considera normal mientras que un intervalo QT superior a 450 milisegundos en hombres y 470 milisegundos en mujeres se considera generalmente prolongado (64).

Fragmentos de anticuerpos

La presente invención engloba fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos pueden generarse por medios tradicionales tales como digestión enzimática, o por técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias hay ventajas de uso de fragmentos de anticuerpos en vez de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite la rápida eliminación, y puede conducir al acceso mejorado a tumores sólidos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos véase Hudson y col. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan y col., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora ser directamente producidos por células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv pueden todos expresarse en y secretarse de *E. coli*, permitiendo así la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos tratadas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de cultivo de células huésped recombinantes. El fragmento Fab y F(ab')₂ con elevada semivida *in vivo* que comprende residuos del epítipo de unión al receptor de rescate se describe en la patente de EE.UU. nº 5.869.046. Otras

técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; las patentes de EE.UU. nº 5.571.894; y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; así, pueden ser adecuadas para la unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión de scFv para dar la fusión de una proteína efectora en tanto el extremo amino como el carboxi de un scFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, arriba. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.641.870. Tales anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos

10 **Anticuerpos humanizados**

La invención engloba anticuerpos humanizados. En la técnica se conocen diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente en lo sucesivo residuos de "importación", que se toman normalmente de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann y col. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen y col. (1988) *Science* 239:1534-1536) sustituyendo las secuencias de la región hipervariable con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. nº 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la preparación de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado procedimiento "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor es entonces aceptada como la región estructural humana para el anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, Sims y col. (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia y col. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes. Véanse, por ejemplo, Carter y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta y col. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623.

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

50 **Anticuerpos humanos**

Los anticuerpos humanos de la invención pueden construirse combinando secuencia(s) del dominio variable del clon de Fv seleccionada(s) de bibliotecas de expresión en fago derivadas de ser humano con secuencia(s) del dominio constante humana(s) conocida(s) como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden prepararse por el procedimiento de hibridoma. Se han descrito líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner y col., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras la inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz del gen de inmunoglobulina de la línea germinal

humana en tales ratones mutantes de la línea germinal producirá la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362: 255 (1993); Bruggemann y col., Year in Immunol., 7: 33 (1993).

5 También puede usarse barajado de genes para derivar anticuerpos humanos de no humanos, por ejemplo, anticuerpos de roedor, en el que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. Según este procedimiento, que también se llama "sellado de epítopes", tanto la región variable de la cadena pesada como de la ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de expresión en fago como se describen en el presente documento están sustituidas con un repertorio de genes del dominio V humano, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana / cadena humana. La selección con antígeno produce el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana / cadena humana en el que la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido tras la eliminación de la cadena no humana correspondiente en el clon de expresión en fago primario, es decir, el epítope gobierna (sella) la elección del componente de la cadena humana. Si el procedimiento se repite con el fin de sustituir la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano

20 Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es por la isoforma JM-a de HER4 y la otra es por cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopes diferentes de la isoforma JM-a de HER4. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos a células que expresan la isoforma JM-a de HER4. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a la isoforma JM-a de HER4 y un brazo que se une a un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Los procedimientos de preparación de anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature 305:537 (1993)). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace normalmente por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se desvelan en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993 y en Trauneker y col., EMBO J., 10:3655 (1991).

Según un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios que combinan anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En ciertas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales produzca altos rendimientos o cuando las relaciones no sean de significancia particular.

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

65 Según otro enfoque, la superficie de separación entre un par de moléculas de anticuerpos puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de

separación comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la superficie de separación de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean sobre la superficie de separación de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes con más pequeños (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de EE.UU. n° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica y se desvelan en la patente de EE.UU. n° 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

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

El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992), describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')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 así formado podía unirse a células que expresaban en exceso el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, además de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

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

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

Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede ser internalizado (y/o catabolizado) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención puede ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de los de la clase de IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden ser fácilmente producidos por expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En ciertas realizaciones, el dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno del extremo amino a la región Fc. En ciertas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho sitios de unión a antígeno. En una realización tal, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptidos (por ejemplo, dos cadenas de polipéptidos), en el que la(s) cadena(s) de polipéptidos comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de

polipéptidos puede(n) comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender: cadena de VH-CH1-conector flexible-VH-CH1-región Fc; o cadena de VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender adicionalmente al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de la cadena ligera y, opcionalmente, además comprenden un dominio CL.

Anticuerpos de un único dominio

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de un único dominio. Un anticuerpo de un único dominio es una cadena de un único polipéptido que comprende toda o una porción del dominio variable de la cadena pesada o toda o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo de un único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.248.516 B1). En una realización, un anticuerpo de un único dominio puede consistir en toda o una porción del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

Variantes de anticuerpo

En algunas realizaciones se contemplan modificación (modificaciones) de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede desearse mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo pueden prepararse introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede hacerse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento de prepararse la secuencia.

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

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

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención es alterado para aumentar o disminuir el grado al que el anticuerpo está glucosilado. La glucosilación de polipéptidos está normalmente tanto ligada a N como ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión de un resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina en las que X es cualquier aminoácido, excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, el más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina.

La adición o deleción de sitios de glucosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que se creen o se eliminen una o más de las secuencias de tripéptidos anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición, deleción o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Si el anticuerpo comprende una región Fc, el hidrato de carbono unido al mismo puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero normalmente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que está generalmente unido por un N-enlace a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright y col. (1997) TIBTECH 15:26-32. El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, además de una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, pueden hacerse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención con el fin de crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

Por ejemplo, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de hidrato de carbono que carece de fucosa unida (directamente o indirectamente) a una región Fc. Tales variantes pueden tener función de ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. n° US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki y col. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki y col. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en la fucosilación de proteínas (Ripka y col. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); solicitud de patente de EE.UU. n° US 2003/0157108 A1, Presta, L; y documento WO 2004/056312 A1, Adams y col., especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares de genes inactivados tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO de genes inactivados (Yamane-Ohnuki y col. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. y col., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107).

Se proporcionan adicionalmente variantes de anticuerpos con oligosacáridos cortados en dos, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se corta en dos por GlcNAc. Tales variantes de anticuerpos pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Ejemplos de tales variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet y col.); patente de EE.UU. n° 6.602.684 (Umana y col.); y documento US 2005/0123546 (Umana y col.). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Tales variantes de anticuerpos pueden tener función de CDC mejorada. Tales variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087 (Patel y col.); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran adicionalmente ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de residuos). Tales sustituciones pueden producirse en combinación con cualquiera de las variaciones descritas anteriormente.

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas las funciones efectoras, que hace que sea un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aunque ciertas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, las actividades de Fc del anticuerpo se miden para garantizar que solo se mantienen las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por tanto, que carece probablemente de actividad de ADCC), pero retiene capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, las células NK, expresan FcR1III solo, mientras que los monocitos expresan FcR1, FcR2 y FcR3. La expresión de FcR sobre células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE.UU. n° 5.500.362 (véase, por ejemplo Hellstrom, I. y col. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); documento 5.821.337 (véase Bruggemann, M. y col., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Alternativamente, pueden emplearse procedimientos de ensayo no radiactivo (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos espontáneos (NK). Alternativamente, 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 y col. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por tanto, carece de actividad de CDC. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. y col., Blood 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). La unión a FcRn y las determinación de la eliminación/semivida *in vivo* también pueden realizarse usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. y col., Int'l. Immunol. 18(12): 1759-1769 (2006)).

Se proporcionan otras variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Sitios de interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de

FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "Sustituciones preferidas". Cambios más sustanciales, denominados "Sustituciones a modo de ejemplo", se proporcionan en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente más adelante en referencia a las clases de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y cribarse los productos, por ejemplo, para una actividad deseada, tal como unión del antígeno mejorada, inmunogenicidad reducida, ADCC o CDC mejoradas, etc.

TABLA 1

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

Pueden realizarse modificaciones en las propiedades biológicas de un anticuerpo seleccionando sustituciones que afectan (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) la masa de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse según similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., pág. 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 sin carga: 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)

Alternativamente, los residuos que se producen naturalmente pueden dividirse en grupos basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales:

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

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

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

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

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas supondrán el intercambio de un miembro de una de estas clases con otra clase. Tales residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o, en los sitios (no conservados) restantes.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para el desarrollo posterior tendrá(n) propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) con respecto al anticuerpo parental del que se generan. Una variante de sustitución a modo de ejemplo es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse convenientemente usando técnicas de maduración por afinidad basadas en expresión en fago. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos así generados se expresan en partículas de fago filamentosos como fusiones con al menos parte de una proteína de la envoltura del fago (por ejemplo, el producto génico III de M13) encapsidada dentro de cada partícula. Entonces, las variantes expresadas en fago se criban para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Con el fin de identificar sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, la mutagénesis por barrido (por ejemplo, barrido de alanina) puede realizarse para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas conocidas en la técnica, incluyendo aquellas elaboradas en el presente documento. Una vez se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a cribado usando técnicas conocidas la técnica, incluyendo aquellas descritas en el presente documento, y variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para el posterior desarrollo.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante varios procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una versión de variante o de no variante anteriormente preparada del anticuerpo.

Puede desearse introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los anticuerpos de la invención, generándose así una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos que incluyen la de una cisteína bisagra.

Según esta descripción y las enseñanzas de la materia, se contempla que en algunas realizaciones un anticuerpo de la invención pueda comprender una o más alteraciones con respecto al anticuerpo homólogo natural, por ejemplo, en la región Fc. Sin embargo, estos anticuerpos retendrían sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica con respecto a su homólogo natural. Por ejemplo, se cree que pueden hacerse ciertas alteraciones en la región Fc que producirían unión de C1q alterada (es decir, tanto mejorada como disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); la patente de EE.UU. nº 5.648.260; la patente de EE.UU. nº 5.624.821; y el documento WO94/29351 referente a otros ejemplos de variantes de región Fc. El documento WO00/42072 (Presta) y el documento WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a FcR. Véase también Shields y col., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semividas elevadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim y col., J. Immunol. 24:249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton y col.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en su interior que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Las variantes de polipéptidos con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q elevada o disminuida se describen en la patente de EE.UU. nº 6.194.551B1, documento WO99/51642. El contenido de aquellas publicaciones de patente se incorpora específicamente en el presente documento por referencia. Véase también Idusogie y col. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la superficie de separación de polipéptidos de Fc que comprenden la región Fc, en los que las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido de Fc y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, siendo la protuberancia posicionable en la cavidad de manera que se promueva la complejación del primer y segundo polipéptidos de Fc. Los procedimientos de generación de anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.731.168.

En otro aspecto más, puede desearse crear anticuerpos manipulados con cisteína, por ejemplo, "tioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo están sustituidos con residuos de cisteína. En realizaciones particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo aquellos residuos con cisteína, grupos tiol reactivos están así posicionados en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, uno cualquiera o más de los siguiente residuos puede estar sustituido con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración de EU) de

la cadena pesada; y S400 (numeración de EU) de la región Fc de la cadena pesada.

Derivados de anticuerpos

- 5 Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteináceos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (tanto homopolímeros como copolímeros al azar) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o sin ramificar. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si está unido más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que va a mejorarse, si el anticuerpo derivado se usará o no en una terapia en condiciones definidas, etc.
- 20 En otra realización se proporcionan conjugados de un anticuerpo y resto no proteináceo que pueden calentarse selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteináceo es un nanotubo de carbono (Kam y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a, longitudes de onda que no dañan células ordinarias, pero que calientan el resto no proteináceo a una temperatura a la que se destruyen las células próximas al anticuerpo-resto no proteináceo.

25

Ciertos procedimientos de preparación de anticuerpos

Ciertos procedimientos basados en hibridoma

- 30 Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden prepararse usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256:495 (1975), y descrito adicionalmente, por ejemplo, en Hongo y col., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow y col., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling y col., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) referente a hibridomas humano-humano. Procedimientos adicionales incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 7.189.826 referente a la producción de anticuerpos IgM naturales humanos monoclonales de líneas celulares de hibridoma. La tecnología de hibridomas humanos (tecnología de Trioma) se describe en Vollmers y Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005).
- 40 Para diversas otras técnicas de hibridoma, véanse, por ejemplo, los documentos US 2006/258841; US 2006/183887 (anticuerpos completamente humanos), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; y las patentes de EE.UU. nº 7.078.492 y 7.153.507. Un protocolo a modo de ejemplo para producir anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma se describe del siguiente modo. En una realización, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para provocar linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Los anticuerpos se producen en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido que comprende la isoforma JM-a de HER-4, o un fragmento del mismo, y un adyuvante, tal como monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT). Un polipéptido que comprende la isoforma JM-a de HER-4 o un fragmento del mismo puede prepararse usando procedimientos muy conocidos en la técnica, tales como procedimientos recombinantes, algunos de los cuales se han descrito adicionalmente en el presente documento. Se ensaya suero de animales inmunizados para anticuerpos anti-isoforma JM-a de HER-4, y opcionalmente se administran inmunizaciones de refuerzo. Se aíslan los linfocitos de animales que producen los anticuerpos anti-isoforma JM-a de HER-4. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

55

- A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado tal como polietilenglicol para formar una célula de hibridoma. Véase, por ejemplo, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986). Pueden usarse células de mieloma que se fusionan eficientemente, soportan producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Células de mieloma a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, líneas de mieloma murino tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección americana de cultivos tipo, Rockville, Mariland, EE.UU. Las líneas de células de mieloma humano y heteromiéloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur y col., Monoclonal Antibody

65

Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales sin fusionar. 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), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT. Preferentemente, se usan procedimientos de cultivo de células de hibridoma sin suero para reducir el uso de suero derivado de animal tal como suero bovino fetal, como se describe, por ejemplo, en Even y col., Trends in Biotechnology, 24(3), 105-108 (2006).

Oligopéptidos como herramientas para mejorar la productividad de cultivos de células de hibridoma se describen en Franek, Trends in Monoclonal Antibody Research, 111-122 (2005). Específicamente, medios de cultivo estándar están enriquecidos con ciertos aminoácidos (alanina, serina, asparagina, prolina), o con fracciones de hidrolizado de proteína, y la apoptosis puede suprimirse significativamente por oligopéptidos sintéticos, constituidos por tres a seis residuos de aminoácidos. Los péptidos están presentes a concentraciones milimolares o mayores.

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma están creciendo puede ensayarse para la producción de anticuerpos monoclonales que se unen a la isoforma JM-a de HER4. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma puede determinarse por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard. Véase, por ejemplo, Munson y col., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificarse células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante procedimientos convencionales. Véase Goding, arriba. 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 ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Un procedimiento para el aislamiento de proteínas de células de hibridoma se describe en el documento US 2005/176122 y la patente de EE.UU. n.º 6.919.436. El procedimiento incluye usar sales mínimas, tales como sales liotrópicas, en el procedimiento de unión y preferentemente también usar pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en el procedimiento de elución.

Ciertos procedimientos de cribado de bibliotecas

Los anticuerpos de la invención pueden producirse usando bibliotecas combinatorias para cribar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conocen varios procedimientos para generar bibliotecas de expresión en fago y cribar tales bibliotecas para anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Tales procedimientos se describen generalmente en Hoogenboom y col. (2001) en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien y col., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). Por ejemplo, un procedimiento de generación de anticuerpos de interés es mediante el uso de una biblioteca de anticuerpos de fago como se describe en Lee y col., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93.

En principio, clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan cribando bibliotecas de fagos que contienen el fago que muestra diversos fragmentos de la región variable (Fv) del anticuerpo fusionada con la proteína de la envoltura del fago. Tales bibliotecas de fagos son inmunopurificadas por cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos de Fv que pueden unirse al antígeno deseado son adsorbidos al antígeno y, por tanto, se separan de los clones de no unión en la biblioteca. Entonces, los clones de unión se eluyen del antígeno y pueden enriquecerse adicionalmente por ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Cualquiera de los anticuerpos de la invención puede obtenerse diseñando un procedimiento de cribado de antígenos adecuado para seleccionar el clon del fago de interés, seguido de la construcción de un clon del anticuerpo de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon del fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3.

En ciertas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada una de ellas de las cadenas ligeras (VL) y pesadas (VH), que presentan ambas tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden expresarse funcionalmente en fago, tanto como fragmentos de Fv monocatenarios (scFv), en los que VH y VL están covalentemente unidas mediante un péptido flexible corto, como fragmentos Fab, en los que cada uno está fusionado con un dominio constante e interactúan no covalentemente, como se describe en Winter y col., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, clones del fago que codifican scFv y clones del fago que codifican Fab se denominan conjuntamente en lo sucesivo "clones del fago

de Fv" o "clones de Fv".

Los repertorios de genes VH y VL pueden clonarse por separado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse al azar en bibliotecas de fagos, que luego pueden buscarse para clones de unión a antígeno como se describe en Winter y col., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunogén sin el requisito de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio sin tratamiento previo puede clonarse para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos para un amplio intervalo de no auto- y también auto-antígenos sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths y col., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las bibliotecas sin tratamiento previo también pueden prepararse sintéticamente clonando los segmentos del gen V sin reorganizar de citoblastos y usando cebadores de PCR que contienen la secuencia al azar para codificar las regiones de CDR3 altamente variables y para realizar la reorganización *in vitro* como se describe por Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

En ciertas realizaciones se usa fago filamentoso para expresar fragmentos de anticuerpos por fusión a la proteína de la envoltura menor pIII. Los fragmentos de anticuerpos pueden expresarse como fragmentos de Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena de polipéptidos por un espaciador de polipéptidos flexible, por ejemplo, como se describe por Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena está fusionada con pIII y la otra es secretada en el periplasma de células huésped bacterianas en las que el ensamblaje de una estructura de Fab-proteína de la envoltura que se expresa en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de la envoltura natural, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom y col., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen de células inmunitarias recogidas de seres humanos o animales. Si se desea una biblioteca sesgada en favor de clones anti-isoforma JM-a de HER4, el sujeto se inmuniza con la isoforma JM-a de HER4 para generar una respuesta de anticuerpos, y células del bazo y/o linfocitos B en circulación distintos de linfocitos de la sangre periférica (PBL) se recuperan para la construcción de bibliotecas. En una realización preferida, una biblioteca de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada en favor de clones anti-isoforma JM-a de HER4 se obtiene generando una respuesta de anticuerpos anti-isoforma JM-a de HER4 en ratones transgénicos que llevan una matriz de genes de inmunoglobulina humana funcional (y que carece de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales) de forma que la inmunización con la isoforma JM-a de HER4 da lugar a anticuerpos humanos productores de linfocitos B contra la isoforma JM-a de HER4. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe más adelante.

El enriquecimiento adicional en poblaciones de células reactivas anti-isoforma JM-a de HER4 puede obtenerse usando un procedimiento de cribado adecuado para aislar linfocitos B que expresan anticuerpo unido a la membrana específico para la isoforma JM-a de HER4, por ejemplo, por separación de células usando cromatografía de afinidad o adsorción de células a la isoforma JM-a de HER4 marcada con fluorocromo, seguido de citometría de flujo (FACS).

Alternativamente, el uso de células del bazo y/o linfocitos B u otros PBL de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie de animal (humana o no humana) en la que la isoforma JM-a de HER4 no sea antigénica. Para bibliotecas que incorporan la construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, los citoblastos se recogen del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes de anticuerpos sin reorganizar. Las células inmunitarias de interés pueden obtenerse a partir de varias especies de animales tales como especies humanas, de ratón, de rata, de lagomorfo, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y aviar, etc.

Segmentos de genes variables de anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluyendo segmentos de VH y VL) se recuperan de las células de interés y se amplifican. En el caso de bibliotecas de genes VH y VL reorganizadas, el ADN deseado puede obtenerse aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos, seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que hacen coincidir los extremos 5' y 3' de los genes VH y VL reorganizados como se describe en Orlandi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), produciendo así diversos repertorios de genes V para la expresión. Los genes V pueden amplificarse a partir de ADNc y ADN genómico, con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores directos basados dentro del segmento J como se describe en Orlandi y col. (1989) y en Ward y col., Nature, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también pueden basarse en el exón conductor como se describe en Jones y col., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), y los cebadores directos dentro de la región constante como se describe en Sastry y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad puede incorporarse degeneración en los cebadores como se describe en Orlandi y col. (1989) o Sastry y col. (1989). En ciertas realizaciones, la diversidad de bibliotecas se maximiza usando cebadores de PCR elegidos como diana para cada familia del gen V con el fin de amplificar todas las disposiciones de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácidos nucleicos de células inmunitarias, por ejemplo, como se describe en el procedimiento de Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o como se describe en el procedimiento de Orum y col., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para clonar el ADN amplificado en vectores de expresión, sitios de restricción raros pueden introducirse dentro del cebador de PCR como una marca en un extremo como se describe

en Orlandi y col. (1989), o por posterior amplificación por PCR con un cebador marcado como se describe en Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Pueden derivarse repertorios de genes V sintéticamente reorganizados *in vitro* de segmentos de genes V. La mayoría de los segmentos de genes VH humanos se han clonado y secuenciado (informado en Tomlinson y col., *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)) y mapeado (informado en Matsuda y col., *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle H1 y H2) pueden usarse para generar diversos repertorios de genes VH con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Los repertorios de VH también pueden prepararse con toda la diversidad de secuencias centrada en un bucle H3 largo de una única longitud como se describe en Barbas y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos de $V\kappa$ y $V\lambda$ humanos se han clonado y secuenciado (informado en Williams y Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) y pueden usarse para producir repertorios de cadenas ligeras sintéticas. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en un intervalo de veces de VH y VL, y longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de considerable diversidad estructural. Tras la amplificación del gen V que codifica ADN, los segmentos del gen V de la línea germinal pueden reorganizarse *in vitro* según los procedimientos de Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Pueden construirse repertorios de fragmentos de anticuerpos combinando repertorios de genes VH y VL juntos de varias formas. Cada repertorio puede crearse en diferentes vectores, y los vectores recombinarse *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe y col., *Gene*, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* por infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse y col., *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* explota la naturaleza bicatenaria de fragmentos Fab para superar el límite en el tamaño de biblioteca impuesto por la eficiencia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL sin tratamiento previo se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. Entonces, las dos bibliotecas se combinan por infección en fago de bacterias que contienen fagémido de manera que cada célula contiene una combinación diferente y el tamaño de biblioteca está limitado sólo por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de manera que los genes VH y VL se recombinan sobre un único replicón y se co-encapsidan en viriones de fago. Estas enormes bibliotecas proporcionan grandes números de diversos anticuerpos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^8 M).

Alternativamente, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblarse juntos por PCR y luego clonarse, por ejemplo, como se describe en Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje por PCR también puede usarse para unir ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador de péptidos flexible para formar repertorios de Fv monocatenarios (scFv). En otra técnica más, "en ensamblaje por PCR en células" se usa para combinar genes VH y VL dentro de linfocitos por PCR y luego clonar repertorios de genes ligados como se describe en Embleton y col., *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por bibliotecas sin tratamiento previo (tanto naturales como sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración por afinidad también puede imitarse *in vitro* construyendo y reseleccionando de bibliotecas secundarias como se describe en Winter y col. (1994), arriba. Por ejemplo, la mutación puede introducirse al azar *in vitro* usando polimerasa propensa a error (informado en Leung y col., *Technique*, 1: 11-15 (1989)) en el procedimiento de Hawkins y col., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) o en el procedimiento de Gram y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, la maduración por afinidad puede realizarse mutando al azar una o más CDR, por ejemplo, usando PCR con cebadores que llevan secuencia al azar que abarca la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados y cribando clones de afinidad superior. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describe un procedimiento para inducir mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de la inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de la cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios de VH o VL seleccionados por expresión en fago con repertorios de variantes del dominio de V que se producen naturalmente obtenidas a partir de donantes no inmunizados y cribar para mayor afinidad en varias rondas de rebarajado de cadenas como se describe en Marks y col., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades de aproximadamente 10^9 M o menos.

El cribado de las bibliotecas puede llevarse a cabo por diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede usarse la isoforma JM-a de HER4 para recubrir los pocillos de placas de adsorción, expresarse sobre células huésped fijadas a placas de adsorción o usarse en la clasificación de células, o conjugarse con biotina para la captura con perlas recubiertas de estreptavidina, o usarse en cualquier otro procedimiento para inmunopurificar bibliotecas de expresión en fago.

Las muestras de bibliotecas de fagos se ponen en contacto con la isoforma JM-a de HER4 inmovilizada en condiciones adecuadas para la unión de al menos una parte de las partículas de fago al adsorbente. Normalmente, las condiciones, que incluyen pH, fuerza iónica, temperatura y similares, se seleccionan para imitar condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y luego se eluyen con ácido, por ejemplo, como se describe

en Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), o con álcali, por ejemplo como se describe en Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o por competencia de antígeno, por ejemplo en un procedimiento similar al procedimiento de competencia por antígeno de Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991). Los fagos pueden enriquecerse 20-1.000 veces en una única ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden cultivarse en cultivo bacteriano y someterse a rondas adicionales de selección.

La eficiencia de la selección depende de muchos factores, que incluyen la cinética de disociación durante el lavado, y de si múltiples fragmentos de anticuerpos en un único fago pueden engranarse o no simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) pueden ser retenidos usando lavados cortos, expresión en fago multivalente y alta densidad de recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta densidad no sólo estabiliza el fago mediante interacciones multivalentes, sino que favorece la unión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) puede promoverse usando lavados largos y expresión en fago monovalente como se describe en Bass y col., Proteínas, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento de antígeno como se describe en Marks y col., Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos de fago de diferentes afinidades, incluso con afinidades que se diferencian ligeramente, para la isoforma JM-a de HER4. Sin embargo, la mutación al azar de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como se realiza en algunas técnicas de maduración por afinidad) es probable que dé lugar a muchos mutantes, la mayoría de los cuales une a antígeno, y algunos con mayor afinidad. Con isoforma JM-a de HER4 limitante, fagos de alta afinidad raros podrían ser más competitivos. Para retener todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos pueden incubarse con la isoforma JM-a de HER4 biotinilada en exceso, pero con la isoforma JM-a de HER4 biotinilada a una concentración de menor molaridad que la constante de afinidad molar diana para isoforma JM-a de HER4. Los fagos de unión por alta afinidad pueden entonces ser capturados por perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina. Tal "captura en equilibrio" permite que los anticuerpos se seleccionen según sus afinidades de unión, con sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con afinidad de tan sólo dos veces superior a un gran exceso de fagos con menor afinidad. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también pueden manipularse para discriminar basándose en la cinética de disociación.

Pueden seleccionarse clones anti-isoforma JM-a de HER4 basándose en la actividad. En ciertas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos anti-isoforma JM-a de HER4 que se unen a células vivas que naturalmente expresan la isoforma JM-a de HER4. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-isoforma JM-a de HER4 que bloquean la unión entre la isoforma JM-a de HER4 y un ligando de la isoforma JM-a de HER4, tal como neuregulina, pero no bloquean la unión entre una neuregulina y una segunda proteína. Los clones de Fv correspondientes a tales anticuerpos anti-isoforma JM-a de HER4 pueden seleccionarse (1) aislando clones anti-isoforma JM-a de HER4 de una biblioteca de fagos como se ha descrito anteriormente y opcionalmente amplificando la población aislada de clones de fago cultivando la población en un huésped bacteriano adecuado; (2) seleccionando la isoforma JM-a de HER4 y una segunda proteína contra la que se desea actividad de bloqueo y de no bloqueo, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones del fago anti-isoforma JM-a de HER4 a la isoforma JM-a de HER4 inmovilizada; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión a la isoforma JM-a de HER4 que solapan o son compartidos con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluyendo los clones que siguen adsorbidos tras la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades de bloqueo/no bloqueo deseadas pueden enriquecerse adicionalmente repitiendo una o más veces los procedimientos de selección descritos en el presente documento.

El ADN que codifica anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o clones de Fv de expresión en fago de la invención se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando cebadores de oligonucleótidos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de las cadenas pesadas y ligeras de interés del molde de ADN de hibridoma o fago). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpo incluyen Skerra y col., Curr. Opin. Immunol., 5: 256 (1993) y Plückthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones de Fv de la invención puede combinarse con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas pueden obtenerse de Kabat y col., arriba) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa o parcial. Se apreciará que regiones constantes de cualquier isotipo puedan usarse para este fin, que incluyen regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que tales regiones constantes puedan obtenerse de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv se derivó del ADN del dominio variable de una especie animal (tal como humana) y luego se fusionó con ADN de la región constante de otra especie animal para formar secuencia(s) codificante(s) para cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa "híbrida" se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en el presente documento. En ciertas realizaciones, un clon de Fv

derivado de ADN variable humano está fusionado con ADN de la región constante humana para formar secuencia(s) codificante(s) para cadenas pesadas y/o ligeras humanas de longitud completa o parcial.

5 El ADN que codifica anticuerpo anti-isoforma JM-a de HER4 derivado de un hibridoma de la invención también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de las cadenas pesadas y cadenas ligeras humanas en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el procedimiento de Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de hibridoma o clon de Fv puede modificarse adicionalmente uniéndose covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina. De este modo se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del clon de Fv o anticuerpos derivados del clon de hibridoma de la invención.

Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

15 También pueden producirse anticuerpos usando procedimientos recombinantes. Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-isoforma JM-a de HER-4, se aísla ácido nucleico que codifica el anticuerpo y se inserta en un vector replicable para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes de vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

Componente de la secuencia señal

25 Un anticuerpo de la invención puede producirse recombinantemente no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan una secuencia señal del anticuerpo nativo, la secuencia señal se sustituye con una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o enterotoxina estable al calor II. Para la secreción de levadura, la secuencia señal nativa puede sustituirse por, por ejemplo, el líder de levadura invertasa, líder de factor α (incluyendo líderes de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamífero están disponibles secuencias señal de mamífero, además de líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

Origen de replicación

40 Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Generalmente, en vectores de clonación esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias autónomamente replicantes. Tales secuencias son muy conocidas para varias bacterias, levadura y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen de plásmido 2μ es adecuado para levadura, y son útiles diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación no se necesita para vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 puede usarse normalmente solo debido a que contiene el promotor temprano).

Componente de gen de selección

55 Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen de selección, también llamado un marcador de selección. Genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para bacilos.

60 Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que son satisfactoriamente transformadas con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y así sobrevive la pauta de selección. Ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para capturar ácido nucleico que codifica anticuerpo, tal como DHFR, glutamina sintetasa (GS), timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, células transformadas con el gen DHFR se identifican cultivando los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Bajo estas condiciones, el gen DHFR se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico co-transformado. Puede usarse una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR endógeno (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Alternativamente, las células transformadas con el gen GS se identifican cultivando los transformantes en un medio de cultivo que contiene L-metionina sulfoximina (Mtx), un inhibidor de GS. Bajo estas condiciones, el gen GS se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico co-transformado. El sistema de selección/amplificación de GS puede usarse en combinación con el sistema de selección/amplificación de DHFR descrito anteriormente.

Alternativamente, las células huésped (particularmente huéspedes naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de interés, gen DHFR natural y otro marcador de selección tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE.UU. nº 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb y col., *Nature*, 282: 39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC nº 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por el crecimiento en ausencia de triptófano. Similarmente, cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan por plásmidos conocidos que llevan el gen *Leu2*.

Además, pueden usarse vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 para transformación de levaduras de *Kluyveromyces*. Alternativamente se informó de un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina bovina recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990). También se han desvelado vectores de expresión de múltiples copias estables para la secreción de albúmina de suero humano recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer y col., *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991).

Componente de promotor

Los vectores de expresión y de clonación generalmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente ligado al ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Promotores adecuados para su uso con huéspedes procariontes incluyen el promotor *phoA*, sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente ligada al ADN que codifica un anticuerpo.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en la dirección 5' del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases en la dirección 5' del inicio de transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas está una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores de levadura que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por condiciones de crecimiento son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas al metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. También se usan ventajosamente potenciadores de levadura con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpos a partir de vectores en células huésped de mamífero puede controlarse, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus del polio, virus de la viruela aviar,

adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus simio 40 (SV40), o de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamífero usando el virus del papiloma bovino como vector se desvela en la patente de EE.UU. nº 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE.UU. nº 4.601.978. Véase también Reyes y col., Nature 297:598-601 (1982) que describe la expresión de ADNc de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Alternativamente, como promotor puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

Componente de elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo de esta invención por eucariotas superiores aumenta frecuentemente insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) que describe elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante del anticuerpo, pero preferiblemente está localizado en un sitio 5' desde el promotor.

Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (células de levadura, hongo, insecto, planta, animal, humana o nucleada de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles de las regiones sin traducir de 5' y, ocasionalmente 3', de ADN eucariotas o virales o ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en su interior.

Selección y transformación de células huésped

Células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento son las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*, además de *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41 P de *B. licheniformis* desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferido es 294 de *E. coli* (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como B de *E. coli*, X1776 de *E. coli* (ATCC 31.537) y W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes.

El anticuerpo de longitud completa, fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpos pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesitan glucosilación y función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) que por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen mayor semivida en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 5.648.237 (Carter y col.), U.S. 5.789.199 (Joly y col.) y U.S. 5.840.523 (Simmons y col.) que describen la región de iniciación de la traducción (TIR) y secuencias señal para optimizar la expresión y secreción. Véase también Charlton, Methods in Molecular Biology, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pág. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*. Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y puede purificarse mediante, por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final puede llevarse a cabo similar al procedimiento para purificar anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es el más comúnmente usado entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el

presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Para una revisión que trata el uso de levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas véase, por ejemplo, Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004).

10 Pueden seleccionarse ciertos hongos y cepas de levadura en los que las rutas de glucosilación se han "humanizado", produciendo la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcialmente o completamente humano. Véanse, por ejemplo, Li y col., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006) (que describe la humanización de la ruta de glucosilación en *Pichia pastoris*); y Gerngross y col., arriba.

15 Células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de planta y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales y variantes y células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Varias cepas virales para transfección está públicamente disponible, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden usarse como virus en el presente documento según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

20 También pueden utilizarse cultivos de células de plantas de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, lenteja de agua (*Lemnaceae*), alfalfa (*M. truncatula*) y tabaco como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIESTM para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

25 Pueden usarse como huéspedes células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de bebé de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-11587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células DHFR-CHO (Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpo véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pág. 255-268.

45 Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

50 Cultivo de células huésped

Las células huésped usadas para producir un anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en varios medios. Medios comercialmente disponibles tales como Ham F10 (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem, 102:255 (1980), las patentes de EE.UU. nº 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Re. nº 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento a concentraciones apropiadas que serían conocidas para aquellos expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto habitual en la técnica.

Purificación de anticuerpo

Si se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o directamente secretarse en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, el residuo particulado, tanto células huésped como fragmentos lisados, pueden eliminarse, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela pasta de células en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos de células pueden eliminarse por centrifugación. Si el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF puede incluirse en cualquiera de las anteriores etapas para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes fortuitos.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, cromatografía por interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, estando la cromatografía de afinidad entre una de las etapas de purificación normalmente preferidas. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio de Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark y col., J. Immunol. Methods 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss y col., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que está unida el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benzeno permiten flujos de velocidad más rápida y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que vaya a recuperarse.

Tras cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes pueden someterse a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, realizado preferentemente a bajas concentraciones de sales (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

En general, diversas metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, pruebas y clínica están bien establecidas en la materia, de acuerdo con las metodologías anteriormente descritas y/o como se consideran apropiadas por un experto en la materia para un anticuerpo particular de interés.

Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados (denominados indistintamente en lo sucesivo "conjugados de anticuerpo-fármaco" o "ADC") que comprenden un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina de proteína, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Se han usado inmunoconjugados para la administración local de agente citotóxicos, es decir, fármacos que destruyen o inhiben el crecimiento o la proliferación de células, en el tratamiento de cáncer (Lambert, J. (2005) Curr. Opin. in Pharmacology 5:543-549; Wu y col (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) i 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drug Deliv. Rev. 26:151-172; patente de EE.UU. 4.975.278). Los inmunoconjugados permiten la administración elegida como diana de un resto de fármaco a un tumor, y la acumulación intracelular en el mismo, en el que la administración sistémica de fármacos sin conjugar puede producir niveles inaceptables de toxicidad para células normales, además de las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin y col., Lancet (15 de marzo de 1986) pág. 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review" en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications (A. Pinchera y col., eds), pág. 475-506. Se ha informado de tanto anticuerpos policlonales como de anticuerpos monoclonales útiles en estas estrategias (Rowland y col., (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87). Los fármacos usados en estos procedimientos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland y col., (1986) arriba). Las toxinas usadas en conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas de plantas tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler y col. (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler y col. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler y col. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu y col., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode y col. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman y col. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342).

Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos o ligandos de receptores de proteínas grandes.

5 ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado sobre la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido por un quelante de conector de tiourea (Wiseman y col. (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman y col. (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig y col. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig y col. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad
10 contra linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B, la administración produce citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo huCD33 ligado a caliqueamicina, fue aprobado en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; patentes de EE.UU. nº 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 ligado por el conector de disulfuro SPP al resto de fármacos maitansinoides, DM1, está avanzando en ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tal como colon, pancreático, gástrico y otros cánceres. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno prostático específico de membrana (PSMA) ligado al resto de fármacos maitansinoides, DM1, está en desarrollo para el posible tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos para CD30 en tumores malignos hematológicos) (Doronina y col. (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) y están en desarrollo terapéutico.

25 En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en el presente documento (por ejemplo, anteriormente). Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcinas, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Está disponible varios radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos
35 incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Se preparan conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando varios agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col. (1987) Science, 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

45 Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

50 Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (longitud completa o fragmentos) conjugado con una o más moléculas de maitansinoide.

55 Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. nº 3.896.111). Posteriormente se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de EE.UU. nº 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

65 Los restos de fármacos maitansinoides son restos de fármaco en conjugados de anticuerpo-fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) favorecen la derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación mediante conectores de no disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) eficaces contra varias líneas celulares

tumorales.

Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, procedimientos de preparación de los mismos y su uso terapéutico se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 ligado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se encontró que el conjugado era altamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugó mediante un conector de disulfuro con el anticuerpo A7 murino que se une a un antígeno en líneas de células de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide se preparan ligando químicamente un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica de tanto el anticuerpo como la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en potenciar la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente la función o solubilidad del anticuerpo, aunque incluso se esperaría que una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad con respecto al uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son muy conocidos en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Maitansinoides adecuados se desvelan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones de no patente citadas anteriormente en el presente documento. Maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tal como diversos ésteres de maitansinol.

Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide que incluyen, por ejemplo, los desvelados en la patente de EE.UU. nº 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B1, Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992), y la solicitud de patente de EE.UU. nº 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente de conector SMCC pueden prepararse como se desvela en la solicitud de patente de EE.UU. nº 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa o lábiles de esterasa, como se desvela en las patentes anteriormente identificadas, siendo preferidos los grupos disulfuro y tioéter. Grupos de enlace adicionales se describen y ejemplifican en el presente documento.

Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide pueden prepararse usando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzono). Agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) y 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

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

Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con dolastatinas o análogos y derivados peptídicos de dolostatina, las auristatinas (patentes de EE.UU. nº 5635483; 5780588). Se ha mostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke y col. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit y col. (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42:2961-2965). El resto del fármaco dolastatina o auristatina puede unirse al anticuerpo mediante el extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

Realizaciones de auristatina a modo de ejemplo incluyen el extremo N ligado a restos del fármaco monometilauristatina DE y DF, desvelado en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", nº de serie de EE.UU. 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004.

5 Normalmente, los restos de fármaco basados en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pág. 76-136, 1965, Academic Press) que es muy conocido en el campo de la química de los péptidos. Los restos del fármaco auristatina/dolastatina pueden prepararse según los procedimientos de: documentos US 5635483; US 5780588; 10 Pettit y col. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit y col. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., y col. Synthesis, 1996, 719-725; y Pettit y col. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863. Véanse también Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", nº de serie de EE.UU. 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004 (que desvela, por ejemplo, 15 conectores y procedimientos de preparación de compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados a conectores).

Caliqueamicina

20 En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina puede producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones inferiores a picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina véanse las patentes de 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas a American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ^1_1 (Hinman y col., Cancer Research 53:3336-3342 25 (1993), Lode y col., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE.UU. anteriormente mencionadas a American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios de acción intracelular y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes por la internalización mediada por 30 anticuerpos potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen BCNU, estreptoamicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida conjuntamente el complejo LL-E33288 descrito en las patentes de 35 EE.UU. 5.053.394, 5.770.710, además de esperamicinas (patente de EE.UU. 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), 40 cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, 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 *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una 45 desoxirribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Están disponibles varios isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen At^{211} , 50 I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Si el conjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, Tc^{99m} o I^{123} , o una marca de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como obtención de imágenes de resonancia magnética, irm), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Las radiomarcas u otras marcas pueden incorporarse en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e 60 In^{111} pueden unirse por un residuo de cisteína en el péptido. Itrio-90 puede unirse por un residuo de lisina. El procedimiento IODOGEN (Fraker y col. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros procedimientos en detalle.

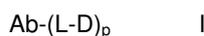
Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando varios agentes de acoplamiento de 65 proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres

(tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un conector lábil de ácido, conector sensible a peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992); patente de EE.UU. nº 5.208.020).

Los compuestos contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos de conector cruzado: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco

En los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), un anticuerpo (Ab) está conjugado con uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, mediante un conector (L). El ADC de fórmula I puede prepararse por varias rutas empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia que incluyen: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo de conector bivalente para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo de conector bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Procedimientos adicionales para preparar ADC se describen en el presente documento.



El conector puede estar compuesto por uno o más componentes de conector. Componentes de conector a modo de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC") y (4-yodo-acetil)aminobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB"). Componentes de conector adicionales se conocen en la técnica y algunos se describen en el presente documento. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", nº de serie de EE.UU. 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004.

En algunas realizaciones, el conector puede comprender residuos de aminoácidos. Componentes de conector de aminoácidos a modo de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Dipéptidos a modo de ejemplo incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Tripéptidos a modo de ejemplo incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Residuos de aminoácidos que comprenden un componente de conector de aminoácidos incluyen aquellos que se producen naturalmente, además de aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que se producen no naturalmente, tales como citrulina. Los componentes de conector de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina del extremo N, (ii) grupos amina de la cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar en los que el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de conector y reactivos de conector que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de conector mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitolo). Por tanto, cada puente de cisteína formará teóricamente dos nucleófilos de tiol reactivos. Grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) produciendo la conversión de una amina en un tiol. Pueden introducirse grupos tiol reactivos en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos de aminoácidos de cisteína no nativos).

Los conjugados de anticuerpo-fármaco también pueden producirse por modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo de conector o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato para

formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos de conector o restos de fármaco. Los grupos de base de Schiff de iminas resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de hidrato de carbono de un anticuerpo glucosilado con tanto galactosa oxidasa como meta-peryodato de sodio pueden dar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina del extremo N pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, produciendo la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento US 5362852). Tal aldehído puede hacerse reaccionar con un resto de fármaco o nucleófilo conector.

Asimismo, los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida que pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de conector y reactivos de conector que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBT, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.

Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado tanto adyacentes entre sí como separadas por una región que codifica un péptido conector que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como estreptavidina) para la utilización en la elección previa como diana de tumores en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de limpieza y luego administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Usos terapéuticos

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para el tratamiento de cáncer, que incluye tumores pre-cancerosos, no metastásicos y cancerosos (por ejemplo, cáncer en estadio temprano), o para el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar cáncer, por ejemplo, cáncer de mama. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos también pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades no malignas, tales como trastornos autoinmunitarios y neurológicos.

Los anticuerpos que son específicos para la isoforma JM-a encuentran utilidad particular en el tratamiento de cánceres u otros trastornos caracterizados por expresión de la isoforma JM-a. En una realización, la isoforma JM-a se expresa en células cancerosas a un mayor nivel que en células no cancerosas del mismo tipo de célula o en células no cancerosas adyacentes a las células cancerosas. En algunas realizaciones, la isoforma JM-a se expresa a niveles que son al menos el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % superiores a los niveles de expresión en las células no cancerosas.

Los anticuerpos que son específicos para la isoforma JM-a encuentran utilidad particular en el tratamiento de cánceres u otros trastornos caracterizados por un elevado nivel de ectodominio de HER4 diseminado. Como se ha presentado en los ejemplos, una serie de muestras de tejido de mama histológicamente normal y de tejido de cáncer de mama recogidas de la misma paciente demostraron que la diseminación del ectodominio HER4 soluble era significativamente elevada en el tejido de cáncer de mama cuando se compara con el tejido de control normal emparejado. Además, la localización nuclear de un epítipo de HER4 intracelular se asocia a desenlace clínico desfavorable cuando se compara con la expresión de HER4 membranoso, que indica que la potenciada escisión de HER4 está asociada a mala supervivencia (29). En una realización, el nivel de ectodominio de HER4 diseminado presente en las células cancerosas está a un mayor nivel que en células no cancerosas del mismo tipo de célula o en células no cancerosas adyacentes a las células cancerosas. En algunas realizaciones, el nivel de ectodominio de HER4 diseminado es al menos el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % superior al nivel de ectodominio de HER4 diseminado en células no cancerosas.

Ejemplos particulares de cánceres que expresan en exceso la isoforma JM-a y/o tienen niveles elevados de ectodominio de HER4 diseminado incluyen cáncer de mama, cáncer de ovario y meduloblastoma (15) (60).

También se espera que cánceres con elevados niveles de mutaciones de HER4 respondan favorablemente al tratamiento con los anticuerpos que se unen específicamente a la isoforma JM-a de HER-4. Tales cánceres incluyen cáncer de pulmón y melanoma (65) (66).

En algunos aspectos de la invención, se selecciona un paciente para el tratamiento con un anticuerpo que es específico para la isoforma JM-a basándose en la determinación de que el paciente tiene un cáncer u otro trastorno caracterizado por la expresión o expresión en exceso de la isoforma JM-a. Como se trata en detalle en la siguiente

sección Procedimientos de diagnóstico, la expresión de la isoforma JM-a de HER-4 puede detectarse usando varios procedimientos que incluyen procedimientos que detectan la presencia del polipéptido de isoforma JM-a, la presencia del polinucleótido de isoforma JM-a, o la presencia de ectodominio de HER4 diseminado.

5 Procedimientos de diagnóstico

Otro aspecto de la invención proporciona procedimientos de determinación de la presencia de la isoforma JM-a de HER-4. En una realización, la presencia de la isoforma JM-a de HER-4 se determina detectando la expresión de la isoforma JM-a. En una realización, la expresión de la isoforma JM-a de HER-4 se determina detectando la presencia del polipéptido de isoforma JM-a. En una realización, la expresión de la isoforma JM-a de HER-4 se determina detectando la presencia del polinucleótido de isoforma JM-a. En otra realización, la expresión de la isoforma JM-a de HER-4 se determina detectando la presencia de ectodominio de HER4 diseminado.

Puede emplearse varios procedimientos para detectar la expresión del polipéptido de isoforma JM-a de HER-4 y/o la presencia de ectodominio de HER4 diseminado e incluyen, por ejemplo, análisis inmunohistoquímico, inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA, citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) y similares. Por ejemplo, un procedimiento opcional de detección de la expresión del polipéptido de la isoforma JM-a de HER-4 y/o ectodominio de HER4 diseminado en un tejido o muestra comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para la isoforma JM-a de HER-4, un fragmento de unión de la isoforma JM-a de HER-4 del mismo, o una proteína recombinante que contiene una región de unión al antígeno de un anticuerpo específico para la isoforma JM-a de HER-4; y a continuación detectar la unión del polipéptido de isoforma JM-a de HER-4 o ectodominio de HER4 diseminado en la muestra.

En realizaciones particulares de la invención, la expresión del polipéptido de isoforma JM-a de HER-4 o presencia de ectodominio de HER4 diseminado en una muestra se examina usando protocolos de inmunohistoquímica y tinción. Se ha mostrado que la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido es un procedimiento fidedigno de evaluación o detección de la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") utilizan un anticuerpo para sondear y visualizar antígenos celulares *in situ*, generalmente por procedimientos cromogénicos o fluorescentes.

Para la preparación de muestras puede usarse una muestra de tejido o célula de un mamífero (normalmente un paciente humano). Ejemplos de muestras incluyen, pero no se limitan a, biopsia de tejido, sangre, aspirado de pulmón, esputo, líquido linfático, etc. La muestra puede obtenerse mediante varios procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, escisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, la muestra se fija e incorpora en parafina o similares.

La muestra de tejido puede fijarse (es decir, preservarse) por metodología convencional (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", 3ª edición (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, Nueva York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.). Un experto en la materia apreciará que la elección de un fijador se determina con el fin de que la muestra sea histológicamente teñida o analizada de otro modo. Un experto en la materia también apreciará que la longitud de fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y el fijador usado. A modo de ejemplo, formalina tamponada neutra, Bouin o paraformaldehído pueden usarse para fijar una muestra.

Generalmente, la muestra se fija primero y luego se deshidrata mediante una serie ascendente de alcoholes, se infiltra y se incorpora en parafina u otros medios de seccionamiento de manera que la muestra de tejido pueda seccionarse. Alternativamente, el tejido puede seccionarse y fijarse las secciones obtenidas. A modo de ejemplo, la muestra de tejido puede incorporarse y procesarse en parafina por metodología convencional (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", arriba). Ejemplos de parafina que pueden usarse incluyen, pero no se limita a, Paraplast, Broloid y Tissuemay. Una vez se ha incorporado la muestra de tejido, la muestra puede seccionarse por un microtomo o similares (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", arriba). A modo de ejemplo para este procedimiento, las secciones pueden oscilar de aproximadamente tres micrómetros a aproximadamente cinco micrómetros de espesor. Una vez se han seccionado, las secciones pueden unirse a portaobjetos por varios procedimientos convencionales. Ejemplos de adhesivos a portaobjetos incluyen, pero no se limitan a, silano, gelatina, poli-L-lisina y similares. A modo de ejemplo, las secciones incorporadas en parafina pueden unirse a portaobjetos positivamente cargados y/o portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina.

Si se ha usado parafina como material de incorporación, las secciones de tejido se desparafinan generalmente y se rehidratan en agua. Las secciones de tejido pueden desparafinarse por varias metodologías estándar convencionales. Por ejemplo, pueden usarse xilenos y una serie gradualmente descendente de alcoholes (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", arriba). Alternativamente pueden usarse agentes no orgánicos desparafinantes comercialmente disponibles tales como Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas).

Opcionalmente, posterior a la preparación de muestras, una sección de tejido puede analizarse usando IHC. La IHC puede realizarse en combinación con técnicas adicionales tales como tinción morfológica y/o hibridación por fluorescencia *in situ*. Están disponibles dos procedimientos generales de IHC; ensayos directos e indirectos. Según el primer ensayo, la unión de anticuerpo al antígeno diana (por ejemplo, isoforma JM-a de HER4) se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado tal como una marca fluorescente o un anticuerpo primario marcado con enzima, que puede visualizarse sin más interacción con el anticuerpo. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario sin conjugar se une al antígeno y luego un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Si el anticuerpo secundario está conjugado con una marca enzimática, un sustrato cromogénico o fluorogénico se añade para proporcionar visualización del antígeno. La amplificación de señales se produce debido a que varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítopes sobre el anticuerpo primario.

El anticuerpo primario y/o secundario usado para inmunohistoquímica normalmente se marcará con un resto detectable. Están disponibles numerosas marcas que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{124}I , ^3H y ^{131}I . El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, volúmenes 1 y 2, Coligen y col., Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991), por ejemplo, y la radiactividad puede medirse usando recuento por centelleo.

(b) Partículas de oro coloidal.

(c) Marcas fluorescentes que incluyen, pero no se limitan a, quelatos de tierras raras (quelatos de europio), Texas Red, rodamina, fluoresceína, dansilo, lisamina, umbeliferona, ficoeriterina, ficocianina, o fluoróforos comercialmente disponibles tales SPECTRUM ORANGE7 y SPECTRUM GREEN7 y/o derivados de uno cualquiera o más de los anteriores. Las marcas fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpo usando las técnicas desveladas en *Current Protocols in Immunology*, arriba, por ejemplo. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro.

(d) Están disponibles diversas marcas enzima-sustrato y la patente de EE.UU. n° 4.275.149 proporciona una revisión de algunas de estas. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química y luego puede emitir luz que puede medirse (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de EE.UU. n° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tal como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan y col., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Method in Enzym.* (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York, 73:147-166 (1981).

Ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en la que la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y

(iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico (por ejemplo, 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa).

Están disponibles numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato para aquellos expertos en la materia. Para una revisión general de éstas véanse las patentes de EE.UU. n° 4.275.149 y 4.318.980. Algunas veces, la marca está indirectamente conjugada con el anticuerpo. El experto conocerá muy bien diversas técnicas para lograr esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las cuatro amplias categorías de marcas mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y, por tanto, la marca puede conjugarse con el anticuerpo en este modo indirecto. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño y uno de los diferentes tipos de marcas mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno. Por tanto, puede lograrse la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo.

Aparte de los procedimientos de preparación de muestras tratados anteriormente, puede desearse tratamiento adicional de la sección de tejido antes de, durante o tras la IHC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo procedimientos de recuperación de epítopes tales como calentamiento de la muestra de tejido en tampón citrato (véase, por ejemplo, Leong y col. *Appl. Immunohistochem.* 4(3):201 (1996)).

Tras una etapa de bloqueo opcional, la sección de tejido se expone a anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y bajo condiciones adecuadas de forma que el anticuerpo primario se una al antígeno de proteína diana en la muestra de tejido. Condiciones apropiadas para alcanzar esto pueden determinarse por experimentación rutinaria. El grado de unión del anticuerpo a la muestra se determina usando una cualquiera de las marcas detectables tratadas anteriormente. Preferentemente, la marca es una marca enzimática (por ejemplo HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico tal como el cromógeno 3,3'-diaminobencidina. Preferentemente, la marca enzimática está conjugada con anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es anticuerpo de cabra anti-conejo).

Los especímenes así preparados pueden montarse y cubrirse con cubreobjetos. Entonces, la evaluación de portaobjetos se determina, por ejemplo, usando un microscopio, y pueden emplearse criterios de intensidad de tinción, usados rutinariamente en la materia. Como un ejemplo, los criterios de intensidad de tinción pueden evaluarse del siguiente modo:

TABLA 2

Patrón de tinción	Puntuación
No se observa tinción en células.	0
Se detecta tinción débil/escasamente perceptible en más del 10% de las células.	1+
Se observa tinción de débil a moderada en más del 10% de las células.	2+
Se observa tinción de moderada a fuerte en más del 10% de las células.	3+

En procedimientos alternativos, la muestra puede ponerse en contacto con un anticuerpo específico para la isoforma JM-a de HER4 bajo condiciones suficientes para que se forme un complejo de anticuerpo-antígeno, y luego detectar dicho complejo. La presencia del complejo puede detectarse de varias formas tales como por transferencia Western y procedimientos de ELISA para ensayar una amplia variedad de tejidos y muestras, que incluyen plasma o suero. Está disponible un amplio intervalo de técnicas de inmunoensayo usando un formato de ensayo tal, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Éstos incluyen tanto ensayos de "sándwich" de un único sitio como de dos sitios de los tipos no competitivos, además de en los ensayos competitivos de unión tradicional. Estos ensayos también incluyen la unión directa de un anticuerpo marcado a un antígeno diana.

Los ensayos de sándwich están entre los ensayos más útiles y comúnmente usados. Existen varias variaciones de la técnica de ensayos de sándwich, y todas pretenden estar englobadas por la presente invención. Brevemente, en un ensayo directo típico, un anticuerpo sin marcar se inmoviliza sobre un sustrato sólido, y la muestra a probarse se pone en contacto con la molécula unida. Después de un periodo de incubación adecuado, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo anticuerpo-antígeno, un segundo anticuerpo específico para el antígeno, marcado con una molécula indicadora que puede producir una señal detectable, se añade luego y se incuba, dejando tiempo suficiente para la formación de otro complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado. Cualquier material sin reaccionar se lava, y la presencia del antígeno se determina por observación de una señal producida por la molécula indicadora. Los resultados pueden ser o bien cualitativos, por simple observación de la señal visible, o bien pueden ser cuantificados comparando con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de antígeno.

Variaciones en el ensayo directo incluyen un ensayo simultáneo en el que tanto muestra como anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son muy conocidas para aquellos expertos en la materia, que incluyen cualquier variación menor como será rápidamente evidente. En un ensayo de sándwich directo típico, un primer anticuerpo que tiene especificidad por el biomarcador se une o bien covalentemente o bien pasivamente a una superficie sólida. La superficie sólida es normalmente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente usados los polímeros celulosa, poli(acrilamida), nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, discos de microplacas o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son muy conocidos en la técnica y generalmente consisten en reticular, unir covalentemente o adsorber físicamente, el complejo polímero-anticuerpo se lava en la preparación para la muestra de prueba. Entonces, una alícuota de la muestra a probar se añade al complejo de fase sólida y se incuba durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, 2-40 minutos o durante la noche si es más conveniente) y bajo condiciones adecuadas (por ejemplo, de temperatura ambiente a 40 °C tal como entre 25 °C y 32 °C, ambos incluidos) para permitir la unión de cualquier subunidad presente en el anticuerpo. Tras el periodo de incubación, la fase sólida de la subunidad de anticuerpo se lava y se seca y se incuba con un segundo anticuerpo específico para una parte del biomarcador. El segundo anticuerpo se liga a una molécula indicadora que se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo al marcador molecular.

Un procedimiento alternativo implica inmovilizar el antígeno diana en la muestra y luego exponer la diana inmovilizada al anticuerpo específico que puede o puede no marcarse con una molécula indicadora. Dependiendo de la cantidad de diana y la concentración de la molécula señal indicadora, una diana unida puede ser detectable por marcado directo con el anticuerpo. Alternativamente, un segundo anticuerpo marcado, específico para el primer

anticuerpo, se expone al complejo diana-primer anticuerpo para formar un complejo terciario diana-primer anticuerpo-segundo anticuerpo. El complejo se detecta por la señal emitida por la molécula indicadora. Por "molécula indicadora", como se usa en la presente memoria descriptiva, se indica una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente identificable que permite la detección de anticuerpo unido a antígeno. Las moléculas indicadoras más comúnmente usadas en este tipo de ensayo son moléculas que contienen o bien enzimas, fluoróforos o bien radionúclidos (es decir, radioisótopos) y moléculas quimioluminiscentes.

En el caso de un enzoinmunoensayo, una enzima se conjuga con el segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o peryodato. Como será fácilmente reconocido, sin embargo, existe una amplia variedad de técnicas de conjugación diferentes, que están fácilmente disponibles para el experto. Las enzimas comúnmente usadas incluyen peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, -galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos que van a usarse con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción, tras la hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa. También es posible emplear sustratos fluorogénicos que dan un producto fluorescente en vez de los sustratos cromogénicos anotados anteriormente. En todos los casos, el anticuerpo marcado con enzima se añade al complejo primer anticuerpo-marcador molecular, se deja que se una y luego se lava el reactivo en exceso. Luego se añade una solución que contiene el sustrato apropiado al complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato reaccionará con la enzima ligada al segundo anticuerpo, dando una señal visual cualitativa que puede cuantificarse adicionalmente, normalmente espectrofotométricamente, dando una indicación de la cantidad de biomarcador que estaba presente en la muestra. Alternativamente, compuestos fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activan por iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía de la luz, induciendo un estado para la excitabilidad en la molécula, seguido de emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Como en EIA, se deja que el anticuerpo marcado fluorescente se una al complejo primer anticuerpo-marcador molecular. Después de lavar el reactivo sin unir, el complejo terciario restante se expone luego a luz de la longitud de onda apropiada. La fluorescencia observada indica la presencia del marcador molecular de interés. La inmunofluorescencia y las técnicas de EIA están ambas muy bien establecidas en la materia. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas indicadoras tales como moléculas de radioisótopo, quimioluminiscentes o bioluminiscentes.

Procedimientos de la invención incluyen adicionalmente protocolos que examinan la presencia y/o expresión de ARNm de la isoforma JM-a de HER-4 en una muestra de tejido o de células. Los procedimientos para la evaluación de ARNm en células son muy conocidos e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementario (tal como hibridación *in situ* usando ribosondas marcadas, transferencia Northern y técnicas relacionadas), y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para la isoforma JM-a de HER-4, y otros procedimientos de detección de tipo amplificación tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares).

Pueden ensayarse convenientemente muestras de tejido o de células de mamíferos para ARNm de la isoforma JM-a de HER4 usando transferencia Northern, puntual o análisis por PCR. Por ejemplo, ensayos de RT-PCR tales como ensayos de PCR cuantitativa son muy conocidos en la técnica. Tales procedimientos pueden incluir una o más etapas que permiten determinar los niveles de ARNm de la isoforma JM-a de HER4 en una muestra biológica (por ejemplo, examinando simultáneamente los niveles de una secuencia de ARNm de control comparativo de un gen de "mantenimiento" tal como un miembro de la familia de actina). Protocolos específicos para determinar la presencia de ARNm de la isoforma JM-a de HER-4 se describen en Junttila, T.T., y col., Clin. Cancer Res. 2003:9:5346-5357 (19).

Realizaciones de material de este aspecto de la invención incluyen cebadores y pares de cebadores de la isoforma JM-a de HER-4, que permiten la amplificación específica de los polinucleótidos de la invención o de cualquier parte específica de los mismos, y sondas que se hibridan selectivamente o específicamente con moléculas de ácidos nucleicos de la invención o con cualquier parte de las mismas. Las sondas pueden marcarse con un marcador detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante metálico o enzima. Tales sondas y cebadores pueden usarse para detectar la presencia de polinucleótidos de la isoforma JM-a de HER4 en una muestra y como un medio para detectar una célula que expresa polipéptidos de la isoforma JM-a de HER-4. Como será entendido por el experto, pueden prepararse muchos cebadores y sondas diferentes basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento y usarse eficazmente para amplificar, clonar y/o determinar la presencia y/o niveles de ARNm de de la isoforma JM-a de HER4.

Procedimientos opcionales de la invención incluyen protocolos que examinan o detectan ARNm tales como ARNm de la isoforma JM-a de HER4 en una muestra de tejido o de células por tecnologías de micromatriz. Usando micromatrices de ácidos nucleicos, muestras de ARNm de prueba y de control y muestras de de tejido de prueba y control se transcriben de forma inversa y se marcan para generar sondas de ADNc. Entonces, las sondas se hibridan con una matriz de ácidos nucleicos inmovilizada sobre un soporte sólido. La matriz está configurada de forma que la secuencia y posición de cada miembro de la matriz sea conocida. Por ejemplo, una selección de genes que tienen potencial para expresarse en ciertos estados de enfermedad puede matrizarse sobre un soporte sólido.

La hibridación de una sonda marcada con un miembro de matriz particular indica que la muestra de la que se derivó la sonda expresa ese gen. Los análisis de expresión génica diferencial de tejido de enfermedad pueden proporcionar información valiosa. La tecnología de micromatrices utiliza técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y tecnología de cálculo para evaluar el perfil de expresión de ARNm de miles de genes dentro de un único experimento (véase, por ejemplo, el documento WO 01/75166 publicado el 11 de octubre de 2001; (véanse, por ejemplo, el documento U.S. 5.700.637, la patente de EE.UU. 5.445.934 y la patente de EE.UU. 5.807.522, Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996); Cheung, V.G. y col., Nature Genetics 21(Suppl):15-19 (1999) para una discusión de la fabricación de matrices). Las micromatrices de ADN son matrices en miniatura que contienen fragmentos de genes que o bien se sintetizan directamente sobre o bien se aplican en puntos sobre vidrio u otros sustratos. Miles de genes están normalmente representados en una única matriz. Un experimento de micromatrices típico implica las siguientes etapas: 1) preparación de diana fluorescentemente marcada de ARN aislado de la muestra, 2) hibridación de la diana marcada con la micromatriz, 3) lavado, tinción y barrido de la matriz, 4) análisis de la imagen barrida y 5) generación de perfiles de expresión génica. Actualmente están usándose dos tipos principales de micromatrices de ADN: matrices de oligonucleótidos (normalmente 25 a 70-meros) y matrices de expresión génica que contienen productos de PCR preparados a partir de ADNc. En la formación de una matriz, los oligonucleótidos pueden o bien prefabricarse y aplicarse en puntos a la superficie o bien sintetizarse directamente sobre la superficie (*in situ*).

El sistema GeneChip® de Affymetrix es un sistema de micromatrices comercialmente disponible que comprende matrices fabricadas mediante síntesis directa de oligonucleótidos sobre una superficie de vidrio. Matrices de sondas/genes: los oligonucleótidos, normalmente 25 meros, se sintetizan directamente sobre una oblea de vidrio mediante una combinación de fotolitografía basada en semiconductores y tecnologías químicas de síntesis en fase sólida. Cada matriz contiene hasta 400.000 oligonucleótidos diferentes y cada oligonucleótido está presente en millones de copias. Como las sondas de oligonucleótidos se sintetizan en localizaciones conocidas sobre la matriz, los patrones de hibridación y las intensidades de señal pueden interpretarse en términos de identidad génica y niveles relativos de expresión por el software Affymetrix Microarray Suite. Cada gen está representado sobre la matriz por una serie de sondas de oligonucleótidos diferentes. Cada par de sondas consiste en un oligonucleótido de apareamiento perfecto y un oligonucleótido de desapareamiento. La sonda de apareamiento perfecto tiene una secuencia exactamente complementaria al gen particular y, por tanto, mide la expresión del gen. La sonda de desapareamiento se diferencia de la sonda de apareamiento perfecto por una única sustitución de bases en la posición de bases central, perturbando la unión del transcrito del gen diana. Esto ayuda a determinar la hibridación de fondo y no específica que contribuye a la señal medida para el oligonucleótido de apareamiento perfecto. El software Microarray Suite resta las intensidades de hibridación de las sondas de desapareamiento de aquellas de las sondas de apareamiento perfecto para determinar el valor de intensidad absoluto o específico para cada conjunto de sondas. Las sondas se eligen basándose en la actual información de Genbank y otros repositorios de nucleótidos. Se cree que las secuencias reconocen regiones únicas del extremo 3' del gen. Se usa un horno de hibridación de GeneChip (horno "asador") para llevar a cabo la hibridación de hasta 64 matrices a la vez. La estación hidráulica realiza el lavado y la tinción de las matrices de sondas. Está completamente automatizada y contiene cuatro módulos, conteniendo cada módulo una matriz de sondas. Cada módulo está controlado independientemente por el software Microarray Suite usando protocolos hidráulicos previamente programados. El escáner es un escáner de fluorescencia láser confocal que mide la intensidad de fluorescencia emitida por el ARNc marcado unido a las matrices de sondas. El terminal de trabajo informático con el software Microarray Suite controla la estación hidráulica y el escáner. El software Microarray Suite puede controlar hasta ocho estaciones hidráulicas usando protocolos de hibridación previamente programados, de lavado y de tinción para la matriz de sondas. El software adquiere y convierte los datos de intensidad de hibridación en una llamada de presencia/ausencia para cada gen usando algoritmos apropiados. Finalmente, el software detecta cambios en la expresión génica entre experimentos por análisis de comparación y formatea las salidas en archivos .txt que pueden usarse con otros programas informáticos para el análisis de datos adicional.

La expresión de una isoforma JM-a de HER-4 también puede evaluarse examinando delección del gen o amplificación del gen. La delección o amplificación del gen puede medirse por uno cualquiera de una amplia variedad de protocolos conocidos en la técnica, por ejemplo, por transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)), transferencia puntual (análisis de ADN) o hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH) usando una sonda apropiadamente marcada, procedimientos citogenéticos o hibridación genómica comparativa (CGH) usando una sonda apropiadamente marcada. A modo de ejemplo, estos procedimientos pueden emplearse para detectar delección o amplificación de genes de la isoforma JM-a de HER-4.

También puede examinarse la expresión de la isoforma JM-a de HER-4 en una muestra de tejido o de células a modo de ensayos funcionales o basados en actividad. Por ejemplo, la expresión de la isoforma JM-a de HER-4 puede detectarse determinando el efecto del tratamiento con enzima convertora del factor de necrosis tumoral alfa (TACE) sobre muestras de tejido o de células que se sospecha que expresan la isoforma JM-a de HER4.

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) terapéuticos de la invención normalmente se preparan para administración parenteral, es decir, bolo, inyección intravenosa, intratumoral con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable y en una forma inyectable estéril de dosificación unitaria. Un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que tiene el grado de pureza deseado se mezcla opcionalmente con diluyentes, vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición (2005) ed. Univ. of the Sciences Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins), en forma de una formulación liofilizada o una solución acuosa.

Los diluyentes, vehículos, excipientes y estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los principios activos farmacéuticos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición (2005) ed. Univ. of the Sciences Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el ADC cuyas matrices están en la forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsula. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (documento 3773919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de gamma-etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para las anteriores vías de administración. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos muy conocidos en la técnica de la farmacia. Técnicas y formulaciones se encuentran generalmente en Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form. 1ª edición (1 de agosto de 2001) Ed Mark Gibson, US Informa Healthcare, Marcel Dekker, CRC Press (ISBN-10 1574911201); Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5ª edición (14 de diciembre de 2005) Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey y Siân C. Owen APhA Publications (ISBN-10: 1582120587).

Tales procedimientos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo con el vehículo que constituye uno o más componentes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo uniformemente e íntimamente en asociación el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, si fuera necesario, moldear el producto.

Las suspensiones acuosas de la invención contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, croscarmelosa, povidona, metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábica; y agentes dispersantes o humectantes tales como una fosfatida que se produce naturalmente (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitano). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como p-hidroxi-benzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más aromatizantes y uno o más edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse según la técnica conocida

usando aquellos agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como una solución en 1,3-butano-diol, o prepararse como un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, aceites no volátiles estériles pueden emplearse convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite no volátil suave que incluye mono- o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico pueden asimismo usarse en la preparación de inyectables.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con el material de vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y el modo de administración particular. Por ejemplo, una solución acuosa prevista para infusión intravenosa puede contener de aproximadamente 3 a 500 µg de principio activo por mililitro de solución con el fin de que pueda producirse la infusión de un volumen adecuado a una tasa de aproximadamente 30 ml/h.

Formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y espesantes.

Aunque la administración por vía oral de terapéuticos de proteína está desfavorecida debido a la hidrólisis o desnaturalización en el intestino, pueden prepararse formulaciones adecuadas para administración por vía oral como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos que contiene cada uno una cantidad predeterminada del anticuerpo.

Las formulaciones pueden envasarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua, para inyección inmediatamente antes de uso. Se preparan disoluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito. Formulaciones de dosificación unitaria son aquellas que contienen una dosis diaria o sub-dosis diaria unitaria, como se ha citado en el presente documento anteriormente, o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

Las composiciones de la invención también pueden formularse como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma están comúnmente dispuestos en una formación de bicapa similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describen en Epstein y col., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang y col. 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; documentos US 4485045; US 4544545; US 5013556; WO 1997/38731. Los liposomas pueden generarse por el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizado con PEG (PEG-PE). Los liposomas pueden extraerse a través de filtros de tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' de las composiciones de la presente invención pueden conjugarse con liposomas (Martin y col. 1982 J. Biol. Chem. 257:286-288) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está opcionalmente contenido dentro del liposoma (Gabizon y col. 1989 J. National Cancer Inst. 81(19):1484).

Los anticuerpos de la invención se formularían, dosificarían y administrarían en un modo de acuerdo con la buena práctica médica. Factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que está tratándose, el mamífero particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, el programa de administración y otros factores conocidos para los médicos generales. El anticuerpo no necesita formularse, pero opcionalmente se formula, con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores tratados anteriormente. Éstos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describen en el presente documento, o aproximadamente del 1 al 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se haya determinado empíricamente/clínicamente que es apropiada.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o varios agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que vaya a tratarse, el tipo de anticuerpo, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico adjunto. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para

administración al paciente, tanto si es, por ejemplo, por una o por más administraciones separadas como por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento sería generalmente sostenido hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación a modo de ejemplo del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, 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) puede administrarse al paciente. Tales dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de forma que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga superior inicial, seguida de una o más dosis inferiores. Una pauta de dosificación a modo de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores puede llevarse a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo.

Terapia de combinación

Un anticuerpo de la invención puede combinarse en una formulación de combinación farmacéutica, o pauta de dosificación, como terapia de combinación, con un segundo compuesto que tiene propiedades anticancerígenas. El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o pauta de dosificación puede tener actividades complementarias a las del anticuerpo de la combinación de forma que no se afectan adversamente entre sí.

El segundo compuesto puede ser un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto. Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de la invención también puede tener una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico tal como un inhibidor de la formación de tubulina, un inhibidor de topoisomerasa, un intercalador de ADN o un ligante de ADN.

Pueden combinarse otras pautas terapéuticas con la administración de un agente anticancerígeno identificado según la presente invención. La terapia de combinación puede administrarse como una pauta simultánea o secuencial. Si se administra secuencialmente, la combinación puede administrarse en dos o más administraciones. La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en el que hay un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Ejemplos de tal terapia de combinación incluyen combinaciones con agentes quimioterapéuticos tales como erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), sutent (SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), oxaliplatino (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, GlaxoSmithKline), lonafarnib (SCH 66336), sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs.) y gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN®; alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocuoona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediína caliqueamicina, caliqueamicina gamma 11 y caliqueamicina omega 11; dinemicina, que incluye dinemicina A; bisfosfonatos tales como clodronato; una esperamicina; además de cromóforo de neocarzinostatina y la cromoproteína relacionada cromóforos antibióticos de enediína, aclacinomisinas, actinomicina, antramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterinina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina,

tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiofanol, mepitiofanol, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; recuperador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofílico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ sin Cremophor, albúmina, formulación de nanopartículas de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Tal terapia de combinación también incluye: (i) agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de hormonas sobre tumores tales como antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM) que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo el tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON-toremifeno; (ii) inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; (iii) antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; además de troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de aromatasa; (v) inhibidores de proteínas cinasas tales como, por ejemplo, inhibidores de la ruta de EGFR (EGFR, HER2, HER3 y HER4); (vi) inhibidores de lípido cinasas; (vii) oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en proliferación celular anómala tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; (viii) ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, la ribozima ANGLOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; (ix) vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; (x) agentes antiangiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y (xi) sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

La preparación y programas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse según instrucciones del fabricante o según se determine empíricamente por el médico habitual. La preparación y programas de dosificación para tal quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service*, (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y demostrar ser "sinérgica", es decir, el efecto alcanzado cuando los principios activos se usan juntos es mayor que la suma de los efectos que resulta de usar los compuestos por separado. Puede obtenerse un efecto sinérgico cuando los principios activos: (1) se co-formulan y administran o liberan simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) se administran por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por alguna otra pauta. Cuando se administran en terapia por alternancia, puede obtenerse un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o liberan secuencialmente, por ejemplo, por diferentes inyecciones en jeringuillas separadas. En general, durante la terapia por alternancia, una dosificación eficaz de cada principio activo se administra secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, dosificaciones eficaces de dos o más principios activos se administran juntas.

Artículos de fabricación

Se proporciona un artículo de fabricación, o "kit", que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. El prospecto puede referirse a instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos y que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o avisos referentes al uso de tales productos terapéuticos. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, envase alveolado, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de varios materiales tales como vidrio o plástico.

El artículo de fabricación comprende un recipiente y una formulación de un anticuerpo anti-HER4, o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo, contenido dentro del recipiente. El artículo puede comprender adicionalmente

opcionalmente una etiqueta fijada al recipiente, o un prospecto incluido con el recipiente, que se refiere al uso de la composición de materia para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un tumor. El recipiente que contiene la formulación es eficaz para almacenar y administrar el terapéutico y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La marca o prospecto indica que la formulación se usa para tratar la afección de elección, tal como cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyección bacteriostática (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluye otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Depósito de material

Los siguientes materiales se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

Material	Dep. ATCC nº	Fecha del depósito
Her-4 1H10.1E5	PTA-9655	11 de diciembre de 2008

Este depósito se hizo bajo las provisiones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento de patente y las reglamentaciones en virtud del mismo (Tratado de Budapest). Éste asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito se pondrá a disposición por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y de libre acceso de la progenie del cultivo del depósito al público tras la concesión de la patente de EE.UU. pertinente o tras la apertura a consulta por el público de cualquier solicitud de patente de EE.UU. o extranjera, sea cual sea la que venga primero, y asegura la disponibilidad de la progenie a una determinada por el Comisionado de EE.UU. de patentes y marcas que tienen derecho al mismo según la sección 122 del título 35 del USC y las reglas del Comisionado con arreglo al mismo (incluyendo el artículo 37 del CFR nº 1.14, con particular referencia a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud está de acuerdo que si un cultivo de los materiales en depósito muere o se pierde o se destruye cuando se cultiva bajo condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente sustituidos tras la notificación por otro del mismo. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para poner en práctica la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno según sus leyes de patentes.

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

Se entiende que la aplicación de las enseñanzas de la presente invención a un problema o situación específico estará dentro de las capacidades de un experto en la materia en vista de las enseñanzas contenidas en el presente documento. Ejemplos de los productos de la presente invención y procedimientos representativos para su aislamiento, uso y fabricación aparecen a continuación, pero no debe considerarse que limitan la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Materiales y procedimientos

Anticuerpos anti-HER4.

Se sintetizaron oligonucleótidos específicos basándose en la secuencia de ADN de HER4 (30). Se extrajo ARN celular total de células MDA-MB-453 y se usó como molde en RT-PCR para generar la secuencia codificante del dominio extracelular (ECD) de HER4 humano.

Se construyó una proteína de fusión de gDHER4-ECD ligando las secuencias codificantes para los aminoácidos 1-52 de la glucoproteína D tipo 1 del virus del herpes simple con las secuencias que codifican los aminoácidos 26-640 de HER4 humano. (61) Se insertó el ADNc de gDHER4-ECD en el vector de expresión basado en citomegalovirus pRK5. Esta construcción se transfectó transitoriamente en células 293 de riñón embrionario humano usando un

protocolo estándar de precipitación con fosfato de calcio.

Se preparó una columna de afinidad acoplado el anticuerpo monoclonal anti-gD 5B6 a CNBr-Sepharose (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia). El sobrenadante de las células 293 transfectadas con gDHER4-ECD se concentró 20-40 veces sobre una membrana ym30 (Amicon, Beverly MA) y se cargó sobre la resina de afinidad. La columna se lavó con PBS y el receptor se eluyó con ácido acético 100 mM/NaCl 500 mM a pH 2,4. HER4-ECD se cambió de tampón a PBS y se concentró. La concentración de proteína se determinó por DO280.

Se inmunizaron ratones Balb/c con aproximadamente 5 ug de HER4-ECD en emulsión RIBI MPL + TDM + CWS (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, MT) en sus almohadillas plantares traseras en las semanas 0, 1, 2 y 3. Los ratones inmunizados se probaron para una respuesta de anticuerpos por ELISA. Los ratones con los mayores títulos se administraron con 5 ug adicionales de HER4-ECD en RIBI durante la semana 4. Tres días después, los linfocitos de los nódulos poplíteos e inguinales se fusionaron con la línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653 usando 50 % de polietilenglicol 4000 (Boehringer Mannheim Corporation, Indianápolis, IN) mediante el procedimiento de Oi y Herzenberg, 1980. Las células fusionadas se sembraron a una densidad de 200.000 células por pocillo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos y la selección de hibridomas usando suplemento de medio HAT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) empezó un día después de la fusión. Empezando en el día 10, los sobrenadantes de hibridoma se cribaron para la presencia de anticuerpos específicos para HER4 usando un ensayo de captura radiactiva. Se obtuvieron clones productores de anticuerpos estables por dilución limitante y se produjeron grandes cantidades de mAb específicos en ascitis. Los anticuerpos se purificaron sobre columnas de proteína A-Sepharose (Fermentech, Inc., Edimburgo, Escocia) y se guardaron estériles en PBS a 4 °C.

Tejidos.

Se obtuvieron secciones congeladas de corazón y riñón humanos normales de un niño de cuatro años muerto de una sacudida eléctrica. Diecisiete pares de muestras de tejido congeladas criogénicamente que representan tejido de cáncer de mama humano y periférico histológicamente normal de la misma paciente fueron amablemente proporcionados por el Dr. Manolo M. Morente, Red española nacional de bancos de tejidos tumorales, Centro Nacional Español de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, España. El uso de todas las muestras de tejido fue autorizado por un comité de ética médica, y se obtuvo un consentimiento informado de todos los sujetos del estudio.

Cultivo celular.

Transfectantes COS-7, NIH 3T3-7d que expresan células EGFR, HER2 o HER3 (31) y HEK293 EBNA (Invitrogen, Carlsbad, CA) se mantuvieron en DMEM, y células T-47D y MCF-7 en RPMI, complementado con 10 % de SBF (Autogen Bioclear UK Ltd., Wiltshire, RU) y 1 % de solución de L-glutamina-penicilina-estreptomycin (Sigma-Aldrich).

Construcciones de plásmidos.

Se usaron los plásmidos de expresión pcDNA3.1HER4JM-aCYT-2, pcDNA3.1HER4JM-bCYT-2, pcDNA3.1HER4JM-aCYT-2-HA y pcDNA3.1HER4JM-bCYT-2-HA (26, 32) para expresar transitoriamente las isoformas de HER4 con o sin marcas de hemaglutinina (HA) del extremo carboxi de epítopes en células COS-7. Para generar la construcción de HER4 muerto con cinasa, el sitio de unión de ATP putativo dentro del dominio de cinasa de HER4 se mutó (K751R) en pcDNA3.1HER4JM-aCYT-2 usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio (Stratagene) para producir pcDNA3.1HER4JM-aCYT-2-K751R. Para generar pcDNA3.1HER4ECD, la secuencia codificante del ectodominio de HER4 se derivó de pcDNA3.1HER4JM-aCYT-1 de longitud completa (26) por PCR usando el cebador de 5' TTG GTA CCG CAC CAT GAA GCC GGC GAC AGG AC (SEC ID N°: 3) y el cebador de 3' T TAT CTC GAG TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TTG TGG TAA AGT GGA ATG (SEC ID N°: 4). El cebador de 5' introdujo una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción Kpn I y una secuencia de unión al ribosoma antes del codón de iniciación de la secuencia de HER4. El cebador de 3' introdujo una secuencia codificante de hexahistidina, un nuevo codón de terminación y una secuencia de reconocimiento de endonucleasa Xho I después del último aminoácido extracelular His647 de JM-a de HER4 (23).

Transfecciones.

Células sembradas en placas de 24 pocillos (4×10^4) o placas de 6 pocillos ($1,5 \times 10^5$) se transfectaron con 0,5 - 1 ug de plásmido apropiado usando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche, Mannheim, Alemania) según el protocolo del fabricante.

Producción de dominio extracelular recombinante de HER4.

Se seleccionaron células HEK293 EBNA transfectadas con pcDNA3.1HER4ECD en medio que contenía 150 ug/ml de higromicina B (Roche) y después de la clonación se mantuvieron en presencia de 75 µg/ml de higromicina B. Antes de recuperar el ectodominio soluble del medio, las células se cultivaron en DMEM que contenía 0,5 % de SBF.

El ectodominio marcado con HIS se purificó del medio de cultivo recogido por cromatografía de afinidad por quelato metálico inmovilizado (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, RU) por gradiente de pH escalonado.

5 **Inmunoprecipitación y análisis de transferencia Western.**

Para estudiar la especificidad por isoforma de los anticuerpos monoclonales anti-HER4, células COS-7 se transfectaron transitoriamente con pcDNA3.1HER4JM-aCYT-2, pcDNA3.1HER4JM-bCYT-2, o vector pcDNA3.1. Veinticuatro horas después, las células se lavaron con PBS helado, se lisaron en tampón de lisis (1 % de Triton X-100, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM, 10 ug/ml de aprotinina, 10 ug/ml de leupeptina, ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de sodio 10 mM y fosfato de sodio 10 mM) y se centrifugaron. Los sobrenadantes tanto llevan a ebullición como no a 95 °C durante cinco minutos en tampón de muestra con o sin ditiotreitól (DTT) y se analizaron por SDS-PAGE y transferencia Western, como se ha descrito previamente (21). Se analizó la expresión de ErbB en transfectantes NIH 3T3-7d por transferencia Western bajo condiciones no reductoras usando los siguientes anticuerpos primarios: anti-EGFR (sc-03), anti-HER2 (sc-284), anti-HER3 (sc-285) (todos de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y mAb 1479.

Para el análisis Western de la proteína HER4 en tejido de mama, se cortaron secciones de 80 um de bloques de tejido congelados, se homogeneizaron y se lisaron en tampón de lisis durante la noche a 4 °C en un agitador. Se analizaron alícuotas de lisados equivalentes a 50 ug de proteína total por transferencia Western bajo condiciones no reductoras. Para estudiar el efecto del mAb 1479 sobre la fosforilación de HER4, células MCF-7 y T-47D se dejaron morir durante la noche en RPMI sin suero y se trataron con o sin 1 ug/ml del mAb 1479 durante una hora antes de la estimulación de 30 minutos con 50 ng/ml de neuregulina-1 (NRG-1; R&D, Mineápolis, MN). Lisados celulares equivalentes a 1 mg de proteína total se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-HER4 (HFR-1), se separaron en geles de SDS-PAGE y se analizaron por transferencia Western usando anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY).

Para estudiar la ubiquitinación de HER4, células COS-7 se transfectaron transitoriamente con plásmidos que codifican JM-a CYT-1 o JM-a CYT-2 de longitud completa junto con ubiquitina marcada con Flag (Katz y col. 2002), y se analizaron por inmunoprecipitación de HER4 seguido de transferencia Western anti-Flag, como se ha descrito previamente (32). Las células se trataron durante una hora con o sin 2 ug/ml del mAb 1479 antes del análisis.

30 **Tinción de inmunofluorescencia.**

Se cultivaron células COS-7 sobre cubreobjetos y se transfectaron con pcDNA3.1HER4JM-aCYT-2-HA, pcDNA3.1HER4JM-bCYT-2-HA, o control de vector pcDNA3.1. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se fijaron con metanol, se tiñeron con anti-HER4 (HFR-1; Neomarkers, Fremont, CA) o anti-HA (Roche) en dilución 1:100, seguido de incubación con anticuerpo de cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 o de cabra anti-rata Alexa Fluor 568 (ambos de Molecular Probes, Leiden, Los Países Bajos) en dilución 1:250. Los cubreobjetos se montaron con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Todas las imágenes se obtuvieron por el microscopio de fluorescencia Olympus BX60 (Olympus, Hamburgo, Alemania).

40 **Inmunohistoquímica.**

Se tiñeron secciones congeladas (5 uM) usando 20 ug/ml de los anticuerpos primarios mAb 1479, anti-HER4 (HFR-1), anti-CD44 (Hermes-3; amablemente proporcionado por el Dr. Sirpa Jalcanon, Universidad de Turku, Turku, Finlandia), o un anticuerpo que reconoce un antígeno de linfocitos T de pollo (3g6; amablemente proporcionado por el Dr. Sirpa Jalcanon), y anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 (1:200) o de cabra anti-ratón conjugados con HRP (1:100; Santa Cruz Biotechnology). Para la tinción con peroxidasa, se trataron secciones con sustrato de DAB-peroxidasa (Vector Laboratories) según las instrucciones del fabricante, seguido de tinción con hematoxilina. Para la tinción con inmunofluorescencia, se trataron secciones con 25 mg/ml de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (Sigma-Aldrich) para prevenir el fotoblanqueamiento. Todos los portaobjetos se montaron con mowiol (Calbiochem) y se visualizaron por el microscopio de fluorescencia Olympus BX60.

55 **Ensayo de unión *in vitro*.**

Se incubó ectodominio de HER4 recombinante marcado con HIS (2 ug) con o sin 0,5 ug del mAb 1479 o 3g6. La formación de complejos entre el ectodominio y otras proteínas se visualizó por transferencia Western con anticuerpo anti-penta HIS (Molecular Probes) bajo condiciones no reductoras.

60 **Análisis de escisión de HER4.**

Para estudiar el efecto del mAb 1479 sobre la escisión de HER4, células T-47D se dejaron morir durante 2 horas sin suero y se trataron durante 1 hora con 1 ug/ml de mAb 1479 antes de estimular la escisión con 100 ng/ml de forbol 13-miristato 12-acetato (PMA; Sigma-Aldrich) (23, 33).

65

Para estudiar el efecto del mAb 1479 sobre la eliminación basal del ectodominio de HER4 en medio de cultivo, COS-7 que expresan transitoriamente JM-a CYT-2 de HER4 se trataron con o sin 1 ug/ml del mAb 1479 o 1475 durante veinticuatro horas. La diseminación del ectodominio se analizó a partir de muestras de 60 ul de medio directamente recogido de placas de cultivo celular por transferencia Western con el anticuerpo anti-HER4 mAb 1464.

5

Internalización de HER4.

Se cultivaron células COS-7 sobre cubreobjetos y se transfectaron con pcDNA3.1HER4JM-aCYT-2 o pcDNA3.1HER4JM-aCYT-2K751R muerto con cinasa (32) y Rab5a-GFP (34). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se trataron durante 5 min o 2 horas con 1 ug/ml de mAb 1479. Las células se fijaron con metanol y se tiñeron con anticuerpo de cabra anti-ratón Alexa Fluor 568. Los cubreobjetos se montaron con medio de montaje Vectashield. Se obtuvieron imágenes por el microscopio confocal LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY)

10

Ensayo de proliferación de MTS.

Se dejaron morir células T-47D y MCF-7 durante la noche y se sembraron ($1,5 \times 10^4$ /pocillo) en placas de 96 pocillos en RPMI que contenía 5 % de SBF tratado con carbón vegetal y 1 ug/ml de mAb 1479 o 10 ug/ml de 2C4 (Genentech Inc., South San Francisco, CA). El número de células viables se estimó en momentos de tiempo indicados con el ensayo de proliferación celular no radiactivo CellTiter 96® (Promega, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante.

20

Ensayo de crecimiento independiente del anclaje.

Las capas inferiores que consisten en 2 ml de RPMI, 0,5 % de agar Bacto y 10 % de SBF se aplicaron sobre placas de 6 pocillos. Después de la solidificación de las capas inferiores, capas superiores que consistían en 30.000 células/pocillo en 1,2 ml de RPMI, 0,33 % de agar Bacto y 10 % de SBF con o sin 1 ug/ml del mAb 1479 se aplicaron encima. Todas las muestras se prepararon por triplicado. Las células se incubaron durante 14 días a 37 °C. Las colonias mayores de 8 células se contaron bajo microscopio.

25

30

Análisis estadístico.

Se usó prueba de la t de Student para el análisis estadístico de diferentes momentos de tiempo de MTS y ensayos en agar blando. El análisis incluyó cinco experimentos de MTS independientes y tres de agar blando independientes. Se compararon las cantidades de HER4 y ectodominio de HER4 de longitud completa en tejidos de tumor frente a normales usando pares de tejido tumoral/normal emparejados con la prueba del orden con signo de Wilcoxon.

35

Ejemplo 2 - El mAb 1479 reconoce selectivamente las isoformas JM-a proteolíticamente escindibles de HER4.

Se cribaron veintinueve anticuerpos que secretan clones de hibridoma contra el ectodominio de HER4 para el reconocimiento selectivo de las isoformas de HER4 (Figura 2). Se hizo el isotipado de los anticuerpos monoclonales usando un kit de isotipado MonoAb ID/SP de ratón de Zymed (Zymed, So. San Francisco, CA) según las instrucciones del fabricante. El mapeo de epítopes se realizó por un ELISA de bloqueo cruzado. Los mAb para HER4 se agruparon en epítopes basándose en su capacidad para bloquear la unión de los otros el 50 % o más en comparación con un control de mAb irrelevante. La especificidad de los mAb por HER4 se determinó en un ELISA probando la capacidad de los mAb para HER4 biotinilados para unirse a los dominios extracelulares de HER2 (aa 1-645), HER3 (aa 1-617) y HER4 (aa 1-640) (Genentech, Inc.) recubiertos sobre una placa de ELISA a una concentración de 1 µg/ml.

40

45

50

Se analizaron células COS-7 que expresan transitoriamente las isoformas de HER4 con dominios de yuxtamembrana extracelulares alternativos (JM-a CYT-2 o JM-b CYT-2). Se llevó a cabo análisis Western en tres condiciones que representan diferentes grados de desnaturalización de proteínas (Figura 3). Antes de la SDS-PAGE, las muestras en los carriles 1-3 de la Figura 3 se disolvieron en tampón de muestra sin DTT a temperatura ambiente (no red.); las muestras en los carriles 4-6 se disolvieron en tampón de muestra sin DTT pero calentadas durante 5 min a 95 °C (no red., 95°C); y las muestras en los carriles 7-9 se disolvieron en tampón de muestra que contenía DTT, además de calentadas durante 5 min a 95 °C (reductoras). Se usaron anticuerpos contra el extremo carboxi de HER4 (sc-283 y HFR-1) o contra la marca de HA (anti-HA) para controlar la eficiencia de transfección.

55

60

Uno de los anticuerpos, mAb 1479, reconoció la isoforma JM-a, pero no la isoforma JM-b, cuando se usa como anticuerpo primario en transferencia Western (Figura 3). La señal específica de HER4 se redujo en intensidad cuando las muestras se llevaron a ebullición antes del análisis, y se suprimió totalmente cuando las muestras se llevaron a ebullición, además de someterse a condiciones reductoras con DTT. Esto indica que el anticuerpo mAb 1479 solo reconoce la conformación nativa. Bajo condiciones no reductoras, HER4 apareció como una banda de 150 kD, próxima al tamaño esperado de 144 kD deducido de ADNc (30), y bajo condiciones reductoras como una banda de 180 kD (véase la Fig. 3, panel inferior, carriles 1 frente a 7). La especificidad del mAb 1479 por la isoforma JM-a

65

se confirmó por tinción por inmunofluorescencia de células COS-7 que expresan transitoriamente isoformas de HER4 marcadas con HA. El mAb 1479 reconoció de nuevo epítopes únicamente sobre la superficie de transfectantes de JM-a.

5 Como los miembros de la familia del receptor de ErbB son homólogos, la reactividad cruzada del mAb 1479 con otros receptores de ErbB se evaluó por transferencia Western usando los transfectantes NIH 3T3-7d y NR6 que expresan establemente los diferentes receptores de ErbB (31). El mAb 1479 dio una fuerte señal para HER4 (JM-a CYT-2), con banda borrosa en el análisis Western de células que expresan en exceso EGFR (Figura 4). En la Figura 4, las células NIH 3T3-7d y NR6 (carril 4) parentales (carril 2) o transfectadas (carriles 1 y 3) que expresan diferentes receptores de ErbB se analizaron por transferencia Western usando anti-EGFR (sc-03), anti-HER2 (sc-284), anti-HER3 (sc-285) o el mAb 1479 como anticuerpo primario. Las células NIH 3T3-7d y NR6 parentales expresan HER2 endógeno, que se detectó en todos los transfectantes analizados con anti-HER2.

15 Se usó un enzimoanálisis de adsorción (ELISA) basado en células para ensayar adicionalmente la reactividad cruzada del mAb 1479. El mAb 1479, además de un anticuerpo anti-HER4 de control positivo (sc-283), se unió claramente a transfectantes NR6 que expresan HER4 (JM-a CYT-2) incluso a las menores concentraciones de anticuerpo (1:1000 1,25 ug/ml de mAb 1479; 0,2 ug/ml de sc-283) probadas (Figura 5). Sin embargo, no se observó unión del mAb 1479 a células NIH 3T3-7d que expresan EGFR, HER2 o HER3, o la isoforma JM-b CYT-1 de HER4 incluso a la mayor concentración de anticuerpo probada (1:100, 12,5 ug/ml), mientras que los anticuerpos de control anti-EGFR (sc-03), anti-HER2 (sc-284), anti-HER3 (sc-285) y anti-HER4 (sc-283) demostraron unión (1:100, 2 ug/ml) (Figura 5). Estos datos indican que el mAb 1479 es específico para la isoforma JM-a de HER4.

Ejemplo 3 - El mAb 1479 reconoce el ectodominio diseminado de HER4.

25 Para tratar si el mAb 1479 puede usarse para analizar selectivamente la expresión de las isoformas JM-a de HER-4 *in vivo*, se evaluaron secciones congeladas de riñón y corazón humano por tinción con inmunofluorescencia. Se seleccionaron estos dos tipos de tejido ya que se ha mostrado que expresan exclusivamente tanto las isoformas JM-a (riñón) como JM-b (corazón) (23). Como era de esperar basándose en la especificidad *in vitro* tratada en el Ejemplo 2, el mAb 1479 tiñó específicamente riñón, pero no tejido de corazón. Un anticuerpo de control positivo contra el extremo carboxi de HER4 (HFR-1) tiñó ambos tejidos, y no se observó inmunotinción cuando se usó un anticuerpo de control negativo contra una proteína de linfocitos T de pollo (3g6). Se usó un anticuerpo contra la proteína CD44 anclada a la membrana para visualizar el compartimento de la membrana celular. El patrón de tinción observado para el mAb 1479 se diferenció del observado para HFR-1. Esto puede explicarse por los diferentes epítopes que reconocen, pero más probablemente por el hecho de que la molécula de HER4 se escinde y su ectodominio se disemina en tejido de riñón, como se sugirió por la localización de ICD de HER4 en el núcleo de células glomerulares. También en soporte de la escisión de HER4 en tejido de riñón *in vivo*, el análisis Western de lisados de tejido de riñón demostró que el mAb 1479 reconoció dos bandas importantes (Figura 6). Una migró a 150 kD correspondientes al tamaño de ErbB de longitud completa bajo condiciones no reductoras (véase la Fig. 6, carril 1 frente a la Fig. 3, carril 1) y la otra más destacada una a 100 kD correspondiente al tamaño del ectodominio de HER4 recombinante (Fig. 6, carriles 1 frente a 2). Una tercera banda que migró a aproximadamente 200 kDa fue de tamaño similar a una banda débil en el carril con ectodominio recombinante y representan dímeros del ectodominio.

45 Para demostrar más directamente que el mAb 1479 puede reconocer el ectodominio de HER4 soluble, se llevó a cabo un ensayo de unión *in vitro* con un ectodominio de HER4 recombinante y mAb 1479. Cuando el ectodominio y el anticuerpo se incubaron juntos, formaron un complejo de 250 kDa que se detectó en análisis Western (Figura 7). En este ensayo, el ectodominio de HER4 recombinante marcado con HIS (2 g) se incubó con 0,5 ug de tanto el mAb 1479 como el anticuerpo 3g6 de control negativo durante 15 min y se visualizó la formación de un complejo de proteína por análisis Western bajo condiciones no reductoras usando un anticuerpo anti-HIS. En la Figura 7, el ectodominio libre se observa migrando al tamaño de 100 kDa, anticuerpos libres a 150 kDa y el complejo formado por el ectodominio unido al anticuerpo a 250 kDa.

La neuregulina-1 sola también demostró la unión al ectodominio de HER4 recombinante, confirmando que el ectodominio recombinante usado para la experimentación era funcional. Además, un ELISA con ectodominio de HER4 marcado con HIS inmovilizado sobre placa de micropocillos (100 ng) dio un valor de Kd de 0,85 nM +/- 0,077 para la interacción con el mAb 1479 (a concentraciones que oscilan de 0,195 a 100 nM) (Figura 8). Estas observaciones demuestran que el mAb 1479 se une al ectodominio de HER4 con una afinidad relativamente alta.

Ejemplo 4 - La diseminación del ectodominio de HER4 se potencia en cáncer de mama *in vivo*.

60 Isoformas JM-a escindibles, además de la enzima TACE que puede escindir HER4, se expresan en exceso en tejidos de tumor de mama *in vivo* (29), y el epítipo de HER4 del extremo carboxi está localizado en los núcleos más frecuentemente en tejido de cáncer de mama que en epitelio mamario histológicamente normal (35). Además, la localización nuclear de la inmunorreactividad de HER4 está asociada a supervivencia desfavorable cuando se compara con la inmunorreactividad de la superficie celular (29). Estos hallazgos implican que la escisión de HER4 y la diseminación del ectodominio se potencian en cáncer de mama, en comparación con tejido de mama normal, y que la escisión es de significancia biológica. Para probar si la transformación de tejido de mama histológicamente

normal en carcinoma de mama está asociado a la diseminación potenciada del ectodominio de HER4, se analizaron 17 pares emparejados de tejido de mama normal /cáncer de mama por transferencia Western con el mAb 1479 (Figura 9). Los pares de muestra consistieron en material de tejido congelado de pacientes con cáncer de mama de los que estuvieron disponibles tanto tejido de cáncer como tejido adyacente histológicamente normal. Los datos de Western, generados bajo condiciones no reductoras, se puntuaron para las intensidades de la señal de 150 kD que representa HER4 de longitud completa y la señal de 100 kD que representa ectodominio soluble. Nueve de las 17 (53 %) muestras tumorales demostraron elevada expresión de HER4 total cuando se comparó con el par de tejido normal coincidente. Solo una muestra tumoral (1/17; 6 %) no tuvo expresión de HER4 detectable en comparación con seis muestras de tejido de mama normal (6/17; 35 %) sin HER4 detectable. También se obtuvieron hallazgos similares de niveles de proteína HER4 potenciados en tejidos con cáncer frente a normales por inmunohistoquímica con mAb 1479 usando los mismos pares de muestras.

De forma interesante, la señal para el ectodominio de HER4 se observó en 12 (12/16; 75 %) muestras de tumor positivas para HER4, pero solo en dos muestras de tejido de mama normal positivas para HER4 (2/11; 18 %). Cuando las señales Western para el receptor de longitud completa de 150 kD y el ectodominio de 100 kD se cuantificaron por densitometría, los tejidos tumorales expresaron significativamente más ectodominio de HER4 cuando se comparó con tejidos normales ($P = 0,015$) (Figura 10). Sin embargo, la diferencia en la expresión de HER4 de longitud completa no alcanzó significancia estadística ($P = 0,33$). La cantidad de ectodominio de 100 kD detectado tampoco se correlacionó con la cantidad total de HER4 (100 kD + 150 kD) en la misma muestra ($P = 0,15$). Estos datos sugieren que la regulación por incremento de las cantidades de ectodominio en tejido con cáncer no fue una simple consecuencia de que se produjera más proteína. Además, de los dos pacientes que demostraron niveles de HER4 de longitud completa similar en tejidos normales y con cáncer (pacientes nº 1 y nº 3), ambos demostraron la presencia de ectodominio soluble solo en la muestra tumoral. Tomados conjuntamente, estos datos indican que la eliminación del ectodominio de HER4 se potencia durante la progresión del cáncer de mama, y que el mAb 1479 puede usarse para detectar el ectodominio de HER4 diseminado por tejido tumoral humano.

Ejemplo 5 - El mAb 1479 suprime la fosforilación y escisión de HER4.

Para analizar las consecuencias de la unión del mAb 1479 sobre la función de HER4, se midió la fosforilación de HER4 en células MCF-7 de cáncer de mama que expresan naturalmente isoformas JM-a (26). Se estimularon células MCF-7 durante 1, 2 o 3 horas con 0, 1 o 10 $\mu\text{g/ml}$ de mAb 1479 antes de una estimulación de 15 minutos con 50 ng/ml de neuregulina-1 (NRG-1), y se analizaron para la fosforilación de tirosina de HER4 usando un anticuerpo específico para fosfo contra pTyr1284 de HER4. La membrana se volvió a transferir con anti-HER4 (Abcam) y anti-actina. El mAb 1479 suprimió significativamente la fosforilación estimulada por NRG-1 de HER4 (Figura 11A).

Como la activación de HER4 puede también regular la escisión de HER4 (36), se evaluó el efecto del mAb sobre tanto la escisión basal como estimulada con forbol 13-miristato 12-acetato (PMA). La eliminación del ectodominio de HER4 de 100 kDa en el medio de cultivo de transfectantes COS-7 que expresan JM-a CYT-2 de HER4 se analizó por transferencia Western con un anticuerpo mAb anti-HER4 1464 después de estimular las células durante 24 h con 1 g/ml de mAb 1479 o un anticuerpo de control mAb 1475. Se analizaron lisados celulares totales del mismo experimento por transferencia Western con anti-HER4 (Abcam) y anti-actina (Figura 11B).

El tratamiento con el mAb 1479 disminuyó significativamente la cantidad de ectodominio de HER4 de 110 kDa soluble diseminado en el medio de transfectantes COS-7, cuando se comparó con células no tratadas o células tratadas con mAb1475 que reconoce un epítipo de HER4 diferente (Figura 11B). Estos datos indican que el mAb 1479 bloquea la fosforilación y escisión de tirosina de isoformas JM-a de HER4.

Ejemplo 6 - El mAb 1479 es eficazmente internalizado por un mecanismo dependiente de HER4, pero independiente de la actividad de cinasa de HER4.

Se ha mostrado que la inhibición del crecimiento tumoral por anticuerpos anti-HER2 se asocia a una capacidad intrínseca de los mAb para inducir endocitosis (37). Se observó que el mAb 1479 se empobreció rápidamente de medios de cultivo de células que expresan HER4, pero no de medios de células de control de vector. Para tratar si esto era debido a la internalización mediada por HER4 del mAb, células COS-7 que expresan transitoriamente JM-a de HER4 se trataron con el mAb 1479 y se analizaron por microscopía confocal para visualizar la localización subcelular del anticuerpo. Después de cinco minutos de incubación, el mAb 1479 se detectó predominantemente sobre las superficies celulares. Sin embargo, en dos horas, el anticuerpo se había internalizado en el citosol y parcialmente co-localizado con Rab5 marcado con proteína verde fluorescente (GFP), un marcador de vesículas endocíticas tempranas. No se observó localización citoplásmica del mAb 1479 en células que expresan la isoforma JM-b. Aunque depende de la expresión de HER4, la internalización del mAb 1479 no requirió la actividad de cinasa de HER4, ya que el mAb 1479 también se internalizó eficazmente cuando se analizaron las células COS-7 que expresan transitoriamente una construcción de JM-a muerta por cinasa (K751R).

El mAb 1479 también potenció la ubiquitinación de isoformas JM-a escindibles de HER4, indicando que el mAb 1479 puede estimular activamente la endocitosis de ErB4 en vesículas degradativas como se muestra en la Figura 12. El ensayo en la Figura 12 se realizó usando células COS-7 que expresan transitoriamente JM-a CYT-1 o JM-a CYT-2

junto con ubiquitina marcada con Flag. Las células se trataron durante 0, 10, 30 o 120 minutos con 2 ug/ml de mAb1479 y se analizaron para la ubiquitinación de HER4 por inmunoprecipitación de anti-HER4 con HFR-1, seguido de transferencia Western con un anticuerpo anti-Flag. La carga de proteína HER4 se controló volviendo a transferir con anticuerpo anti-HER4 (Abcam).

Se ha sugerido que Cetuximab suprime el crecimiento tumoral facilitando la regulación por disminución de EGFR (38). Para tratar si la eficaz internalización del mAb 1479 en células que expresan HER4 se asoció con la estimulación de la regulación por disminución de HER4, células MCF-7 que expresan niveles moderados de HER4 endógeno se cultivaron durante hasta 72 horas en presencia de 1 µg/ml de mAb 1479 y se analizaron los niveles totales de HER4 de longitud completa por transferencia Western (Figura 13). Se analizaron niveles de expresión de proteína HER4 en estado estacionario por transferencia Western con un anticuerpo anti-HER4 (Abcam) y la carga se controló con anti-actina. El tratamiento con el mAb 1479, pero no con el anticuerpo de control 3g6 (1 ug/ml), disminuyó significativamente los niveles en estado estacionario de HER4. El efecto ya se observó en el momento de tiempo de 2 horas y duró durante la duración de 72 horas del experimento.

Ejemplo 7 - El mAb 1479 suprime la proliferación y formación de colonias de células de cáncer de mama.

Para estudiar el efecto del mAb 1479 sobre el crecimiento de células de cáncer de mama, se llevaron a cabo ensayos de MTS que miden la cantidad de células viables con líneas celulares de cáncer de mama humano. El mAb 1479 suprimió significativamente la proliferación de células T-47D ($P = 0,0014$) y MCF-7 ($P = 0,047$) (Figura 14). En este ensayo, las líneas celulares se trataron con 1 ug/ml de mAb 1479 o el anticuerpo 2C4 (Genentech) de control positivo durante los periodos de tiempo indicados. El número de células viables se estimaron por el ensayo de MTS. Los anticuerpos redujeron significativamente el número de células viables en el momento de tiempo de 7 días ($*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$; prueba de la t de Student, cinco experimentos independientes llevados a cabo por triplicado). El efecto observado con el mAb 1479 fue similar o más potente cuando se comparó con el anticuerpo 2C4 anti-HER2 (Genentech), que bloquea la heterodimerización de HER2 con otros receptores HER (39).

El mAb 1479 suprimió significativamente el crecimiento independiente del anclaje de tanto células T-47D ($P < 0,001$) como MCF-7 ($P = 0,043$) en ensayos de formación de colonias en agar blando (Figura 15). Las colonias por encima del tamaño de 8 células por x 20 campos en el momento de tiempo de 14 días se calcularon a partir de 10 campos microscópicos por experimento llevado a cabo tres veces. El tratamiento con mAb 1479 redujo significativamente el número de colonias en el momento de tiempo de 14 días cuando se compara con el anticuerpo de control 3g6 ($**P < 0,01$; $***P < 0,001$; prueba de la t de Student, tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado). La media y las desviaciones estándar se muestran en la Figura 15.

Referencias

1. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(2):127-37.
2. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5(5):341-54.
3. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000;19(56):6550-65.
4. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235(4785):177-82.
5. Graham J, Muhsin M, Kirkpatrick P. Cetuximab. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3(7):549-50.
6. Sarup JC, Johnson RM, King KL y col. Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. *Growth Regul* 1991;1(2):72-82.
7. Austin CD, De Maziere AM, Pisacane PI y col. Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Mol Biol Cell* 2004; 15(12):5268-82.
8. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61(12):4744-9.
9. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000;6(4):443-6.
10. Srinivasan R, Poulosom R, Hurst HC, Gullick WJ. Expression of the c-erbB-4/HER4 protein and mRNA in normal human fetal and adult tissues and in a survey of nine solid tumour types. *J Pathol* 1998;185(3):236-45.

11. Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* 2003;200(3):290-7.
- 5 12. Haugen DR, Akslen LA, Varhaug JE, Lillehaug JR. Expression of c-erbB-3 and c-erbB-4 proteins in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res* 1996;56(6):1184-8.
13. Furger C, Fiddes RJ, Quinn DI, Bova RJ, Daly RJ, Sutherland RL. Granulosa cell tumors express HER4 and are sensitive to the cytotoxic action of heregulin-beta2/PE40. *Cancer Res* 1998;58(9):1773-8.
- 10 14. Srinivasan R, Benton E, McCormick F, Thomas H, Gullick WJ. Expression of the c-erbB-3/HER-3 and c-erbB-4/HER-4 growth factor receptors and their ligands, neuregulin-1 alpha, neuregulin-1 beta, and betacellulin, in normal endometrium and endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5(10):2877-83.
- 15 15. Gilbertson RJ, Perry RH, Kelly PJ, Pearson AD, Lunec J. Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma. *Cancer Res* 1997;57(15):3272-80.
16. Gilbertson RJ, Bentley L, Hernan R y col. ERBB receptor signaling promotes ependymoma cell proliferation and represents a potential novel therapeutic target for this disease. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3054-64.
- 20 17. Gullick WJ. c-erbB-4/HER4: friend or foe? *J Pathol* 2003;200(3):279-81.
18. Junttila TT, Sundvall M, Maatta JA, Elenius K. ErbB4 and its isoforms: selective regulation of growth factor responses by naturally occurring receptor variants. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10(7):304-10.
- 25 19. Junttila TT, Laato M, Vahlberg T y col. Identification of patients with transitional cell carcinoma of the bladder overexpressing ErbB2, ErbB3, or specific ErbB4 isoforms: real-time reverse transcription-PCR analysis in estimation of ErbB receptor status from cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9(14):5346-57.
- 30 20. Elenius K, Choi CJ, Paul S, Santiestevan E, Nishi E, Klagsbrun M. Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* 1999;18(16):2607-15.
- 35 21. Kainulainen V, Sundvall M, Maatta JA, Santiestevan E, Klagsbrun M, Elenius K. A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation but not survival or chemotaxis. *J Biol Chem* 2000;275(12):8641-9.
22. Rio C, Buxbaum JD, Peschon JJ, Corfas G. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J Biol Chem* 2000;275(14):10379-87.
- 40 23. Elenius K, Corfas G, Paul S y col. A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester. *J Biol Chem* 1997;272(42):26761-8.
24. Lee HJ, Jung KM, Huang YZ y col. Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *J Biol Chem* 2002;277(8):6318-23.
- 45 25. Komuro A, Nagai M, Navin NE, Sudol M. WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J Biol Chem* 2003;278(35):33334-41.
- 50 26. Määttä JA, Sundvall M, Junttila TT y col. Proteolytic cleavage and phosphorylation of a tumor-associated ErbB4 isoform promote ligand-independent survival and cancer cell growth. *Mol Biol Cell* 2006; 17(1):67-79.
27. Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G. gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 2001;294(5549):2179-81.
- 55 28. Schlessinger J, Lemmon MA. Nuclear signaling by receptor tyrosine kinases: the first robin of spring. *Cell* 2006;127(1):45-8.
29. Junttila TT, Sundvall M, Lundin M y col. Cleavable ErbB4 isoform in estrogen receptor-regulated growth of breast cancer cells. *Cancer Res* 2005;65(4):1384-93.
- 60 30. Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS y col. Ligand-specific activation of HER4/p180HER4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(5):1746-50.
- 65 31. Zhang K, Sun J, Liu N y col. Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *J Biol Chem* 1996;271(7):3884-90.

32. Sundvall M, Peri L, Maatta JA y col. Differential nuclear localization and kinase activity of alternative ErbB4 intracellular domains. *Oncogene* 2007.
- 5 33. Vecchi M, Baulida J, Carpenter G. Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *J Biol Chem* 1996;271(31):18989-95.
34. Gomes AQ, Ali BR, Ramalho JS y col. Membrane targeting of Rab GTPases is influenced by the prenylation motif. *Mol Biol Cell* 2003;14(5):1882-99.
- 10 35. Srinivasan R, Gillett CE, Barnes DM, Gullick WJ. Nuclear expression of the c-erbB-4/HER-4 growth factor receptor in invasive breast cancers. *Cancer Res* 2000;60(6):1483-7.
36. Cheng QC, Tikhomirov O, Zhou W, Carpenter G. Ectodomain cleavage of ErbB-4: characterization of the cleavage site and m80 fragment. *J Biol Chem* 2003;278(40):38421-7.
- 15 37. Hurwitz E, Stancovski I, Sela M, Yarden Y. Suppression and promotion of tumor growth by monoclonal antibodies to ErbB-2 differentially correlate with cellular uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(8):3353-7.
38. Sunada H, Magun BE, Mendelsohn J, MacLeod CL. Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(11):3825-9.
- 20 39. Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM, Sliwkowski MX. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 2004;5(4):317-28.
- 25 40. Barnes NL, Khavari S, Boland GP, Cramer A, Knox WF, Bundred NJ. Absence of HER4 expression predicts recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res* 2005;11(6):2163-8.
41. Suo Z, Risberg B, Kalsson MG y col. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol* 2002;196(1):17-25.
- 30 42. Bieche I, Onody P, Tozlu S, Driouch K, Vidaud M, Lidereau R. Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int J Cancer* 2003;106(5):758-65.
- 35 43. Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ, Haugk B, Leonard RC, Angus B. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *J Clin Pathol* 2003;56(4):300-4.
44. Muraoka-Cook RS, Sandahl M, Husted C y col. The intracellular domain of ErbB4 induces differentiation of mammary epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2006; 17(9):4118-29.
- 40 45. Stem DF. ErbBs in mammary development. *Exp Cell Res* 2003;284(1):89-98.
46. Tang CK, Concepcion XZ, Milan M, Gong X, Montgomery E, Lippman ME. Ribozyme-mediated down-regulation of ErbB-4 in estrogen receptor-positive breast cancer cells inhibits proliferation both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1999;59(20):5315-22.
- 45 47. Zhu Y, Sullivan LL, Nair SS y col. Coregulation of Estrogen Receptor by ErbB4/HER4 Establishes a Growth-Promoting Autocrine Signal in Breast Tumor Cells. *Cancer Res* 2006;66(16):7991-8.
- 50 48. Prewett M, Rothman M, Waksal H, Feldman M, Bander NH, Hicklin DJ. Mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits the growth of human renal cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 1998;4(12):2957-66.
- 55 49. Agus DB, Akita RW, Fox WD y col. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell* 2002;2(2): 127-37.
50. Cho HS, Mason K, Ramyar KX y col. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003;421(6924):756-60.
- 60 51. Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem* 1996;271(9):5251-7.
52. Liu Y, Tao YM, Woo RS, Xiong WC, Mei L. Stimulated ErbB4 internalization is necessary for neuregulin signaling in neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354(2):505-10.
- 65

53. Cuello M, Ettenberg SA, Clark AS y col. Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res* 2001;61(12):4892-900.
- 5 54. Klapper LN, Waterman H, Sela M, Yarden Y. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res* 2000;60(13):3384-8.
55. Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2001;1(2):118-29.
- 10 56. Gilmore JL, Riese DJ, 2nd. secErbB4-26/549 antagonizes ligand-induced HER4 tyrosine phosphorylation. *Oncol Res* 2004;14(11-12):589-602.
57. Bao J, Wolpowitz D, Role LW, Talmage DA. Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J Cell Biol* 2003;161(6):1133-41.
- 15 58. Iivanainen E, Paatero I, Heikkinen SM y col. Intra- and extracellular signaling by endothelial neuregulin-1. *Exp Cell Res* 2007.
59. Borrell-Pages M, Rojo F, Albanell J, Baselga J, Arribas J. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors. *Embo J* 2003;22(5):1114-24.
- 20 60. Gilmour LM, Macleod KG, McCaig A, Gullick WJ, Smyth JF, Langdon SP. Expression of erbB-4/HER-4 growth factor receptor isoforms in ovarian cancer. *Cancer Res* 2001;61(5):2169-76.
61. Paborsky LR y col., Mammalian Cell Transient Expression of Tissue Factor for Production of Antigen. *Protein Eng.* 1990;3(6):547-53.
- 25 62. Chu, T. F. y col., Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Lancet* 2007; 370 (9604):2011-2019.
- 30 63. Force, T. and Kerkela, R., Cardiotoxicity of the new cancer therapeutics - mechanisms of, and approaches to, the problem. *Drug Discov Today* 2008;13(17-18):778-784.
64. Yeh, E.T.H., and Bickford, C.L., Cardiovascular Complications of Cancer Therapy. *J. Am. Coll. Cardio.* 2009;53(24): 2231-2247.
- 35 65. Ding, L. y col., Somatic Mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008;455:1069-1075.
- 40 66. Prickett, T. D. y col., Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nature Genetics* 2009;41:1127 - 1132 (2009).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-HER4 aislado que se une específicamente a la isoforma JM-a de HER-4, anticuerpo que no tiene reactividad cruzada significativa con la isoforma JM-b de HER4, en donde el anticuerpo compite para unirse a la isoforma JM-a con el anticuerpo anti-HER4 mAb 1479 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC que tiene nº de acceso PTA-9655.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une al mismo epítoto que el epítoto al que se une el anticuerpo monoclonal mAb 1479 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC que tiene nº de acceso PTA-9655.
- 15 3. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo comprende un fragmento del anticuerpo monoclonal mAb 1479 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC que tiene nº de acceso PTA-9655, en donde el fragmento comprende las tres regiones hipervariables VH1, VH2 y VH3 y las tres regiones hipervariables VL1, VL2, y VL3 del mAb 1479.
- 20 4. El anticuerpo de la reivindicación 3, en el que el fragmento del anticuerpo monoclonal mAb 1479 comprende las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas del mAb 1479.
- 25 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grado de reactividad cruzada con HER4 JM-b es inferior al
- a) 10 %
 - b) 5 %
 - c) 2 %, o
 - d) 1 %
- 30 como se determina por análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA).
- 35 6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo se une a la isoforma JM-a de HER-4 con afinidad representada por una Kd de 10^{-8} M, o con mayor afinidad.
- 40 7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.
- 45 8. El anticuerpo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal mAb 1479 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC que tiene nº de acceso PTA-9655 o forma humanizada del mismo.
- 50 9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo está ligado a un agente citotóxico.
- 55 10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el anticuerpo tiene menos cardiotoxicidad que un anticuerpo anti-HER4 que reconoce la isoforma JM-b de HER4.
- 60 11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer de mama en un paciente cuyo cáncer expresa la isoforma JM-a de HER-4, comprendiendo el procedimiento administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo.
- 65 12. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 11, en el que el procedimiento para tratar cáncer en un paciente comprende las etapas de:
- a) seleccionar un paciente cuyas células cancerosas expresan o expresan en exceso la isoforma JM-a de HER-4; y
 - b) administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo.
13. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 12, en donde en el procedimiento la expresión de la isoforma JM-a de HER-4 se detecta detectando la presencia del polipéptido de isoforma JM-a, la presencia del polinucleótido de isoforma JM-a, o la presencia de ectodominio de HER4 diseminado.
14. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 13, en donde en el procedimiento se detecta la presencia de ectodominio de HER4 diseminado, que comprende poner en contacto un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 con una muestra de un tumor en el paciente y detectar la unión del anticuerpo al ectodominio de HER4 diseminado.

15. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 14, en el que las células cancerosas del paciente expresan la isoforma JM-a de HER-4 a niveles que son al menos:

- 5 a) 10 %;
 b) 20 %; o
 c) 30 %
 superiores a los niveles de expresión en células no cancerosas del mismo tipo de célula o en células no cancerosas adyacentes a las células cancerosas.
- 10 16. Un procedimiento de detección de la presencia del ectodominio de HER4 diseminado en una muestra de células, que comprende poner en contacto las células con un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y detectar la unión del anticuerpo al ectodominio de HER4 diseminado.

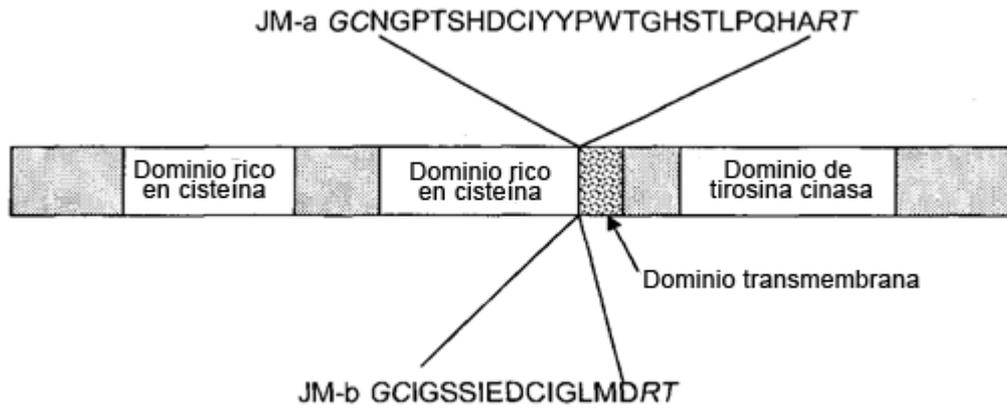


Figura 1

Mab	Isotipo	Epítipo	Especificidad
4-1440	IgG2b, k	B	4
4-1459	IgG2a, k	D	4
4-1460	IgG1, k	C	4
4-1461	IgG2a, k	E	4
4-1462	IgG1, k	C	4
4-1464	IgG2b, k	C	4
4-1465	IgG2a, k	L	3, 4
4-1472	IgG2a, k	M	4
4-1473	IgG2a, k	F	4
4-1474	IgG2b, k	G	4
4-1475	IgG2b, k	P	4
4-1476	IgG2a, k	K	4
4-1477	IgG2a, k	Q	4
4-1479	IgG2a, k	D	4
4-1481	IgG2a, k	H	3, 4
4-1482	IgG2b, k	H	4
4-1483	IgG1, k	R	3, 4
4-1484	IgG1, k	E	4
4-1485	IgG2a, k	F	4
4-1492	IgG2b, k	A	4
4-1494	IgG2b, k	B	4
4-1495	IgG2b, k	A	4
4-1496	IgG1, k	A	3, 4
4-1497	IgG1, k	N	4
4-1498	IgG2b, k	E	4
4-1535	IgG2b, k	B	4
4-1536	IgG2b, k	A	4
4-1537	IgG2b, k	B	4
4-1543	IgG2a, k	O	4

Figura 2

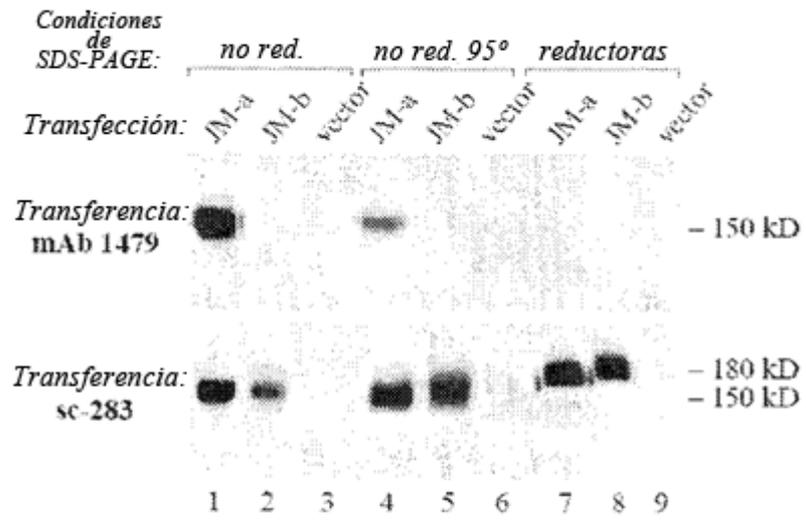


Figura 3

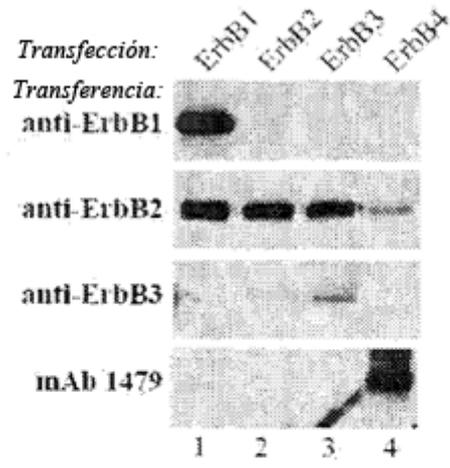


Figura 4

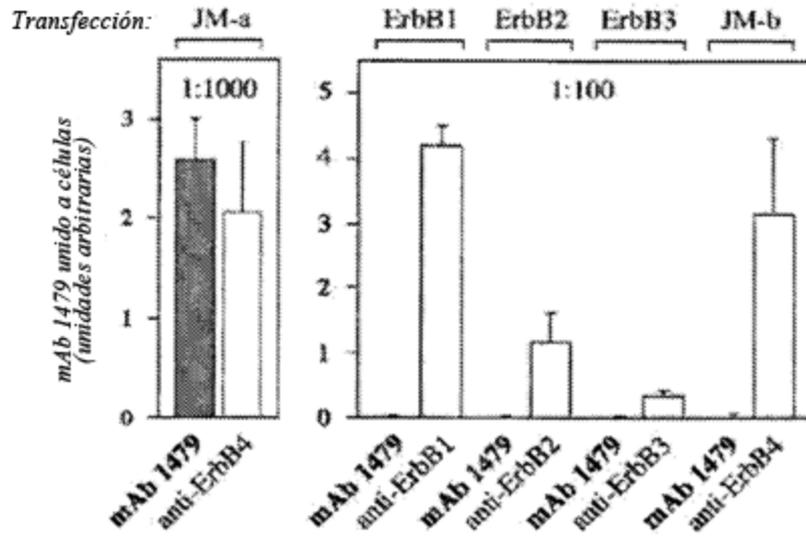


Figure 5

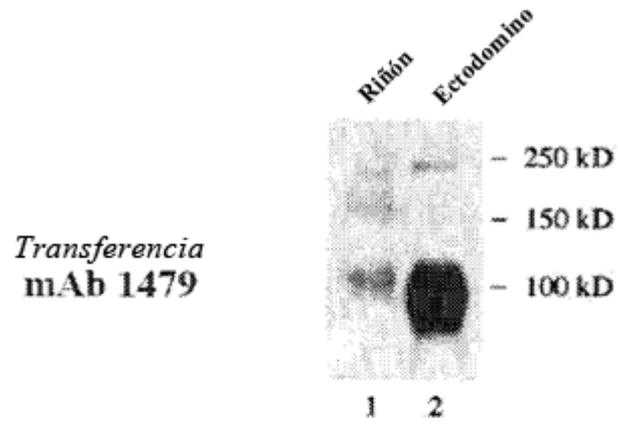


Figura 6

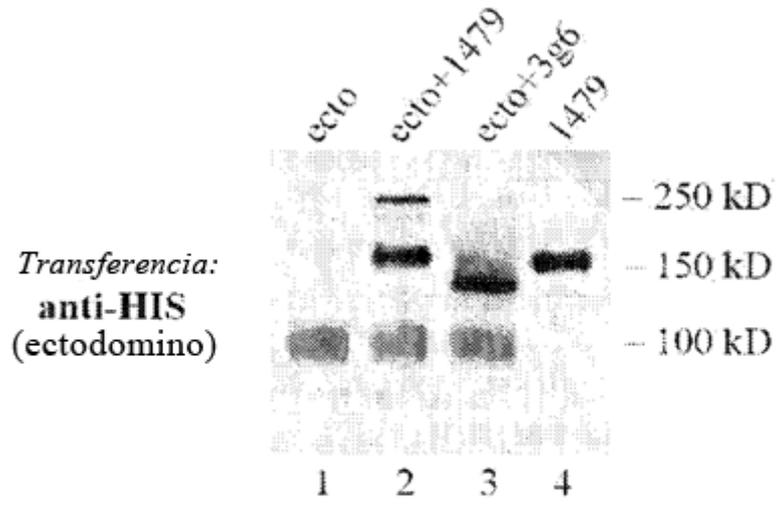


Figura 7

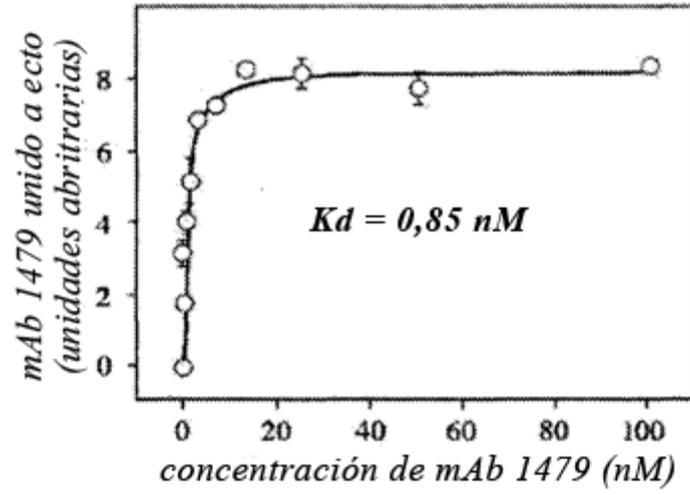


Figura 8

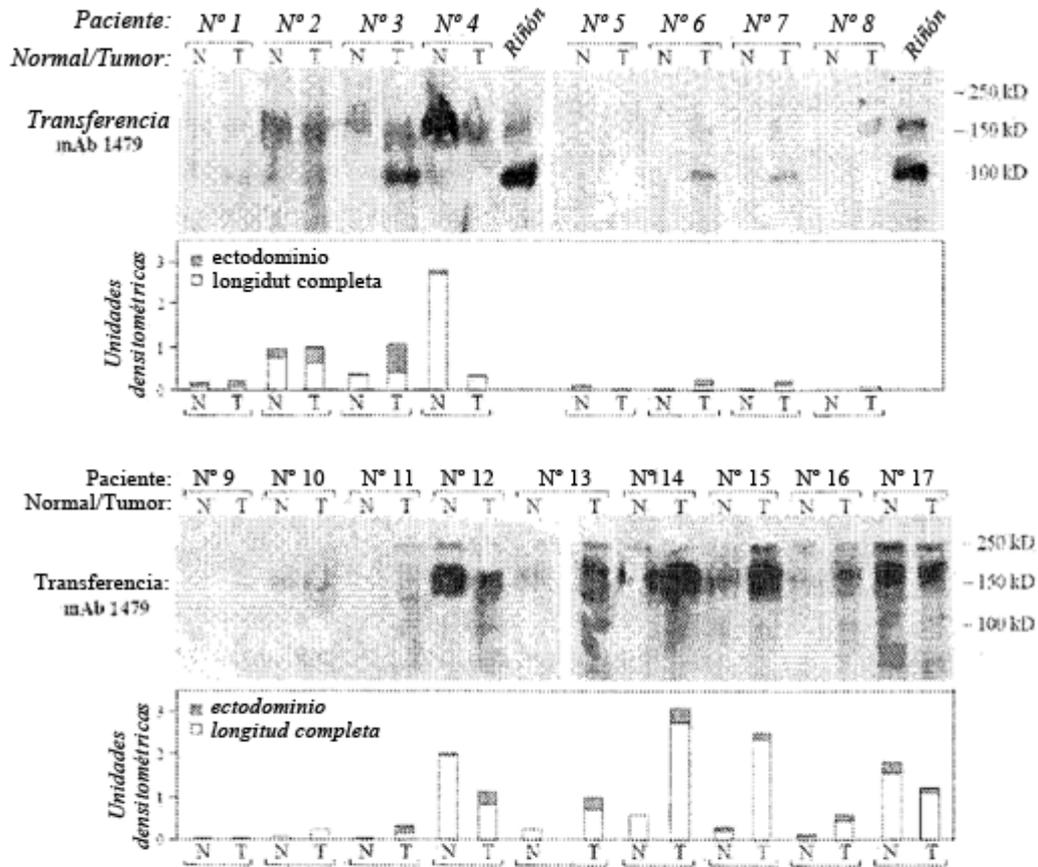


Figura 9

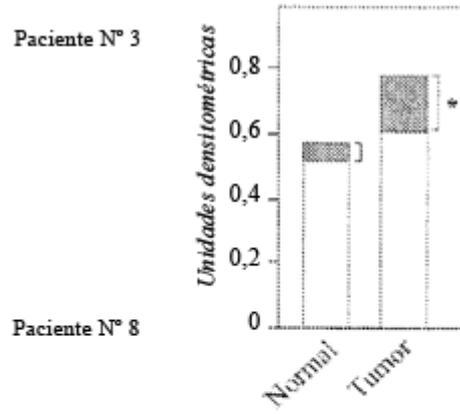


Figura 10

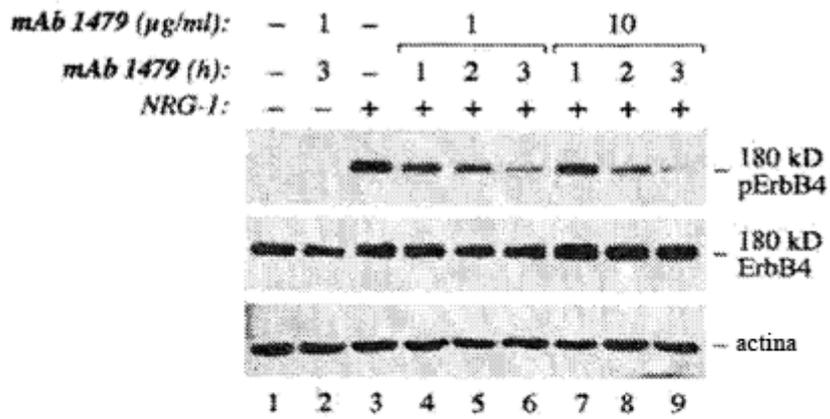


Figura 11A

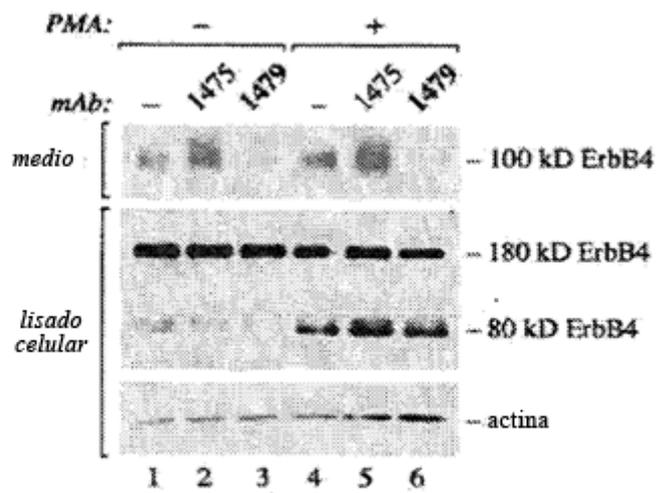


Figura 11B

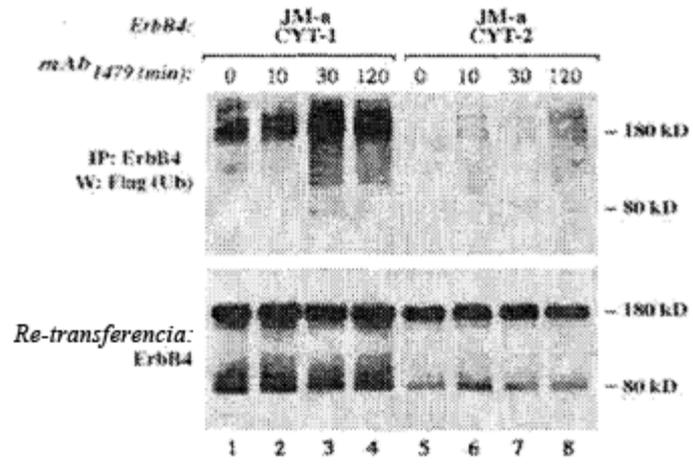


Figura 12

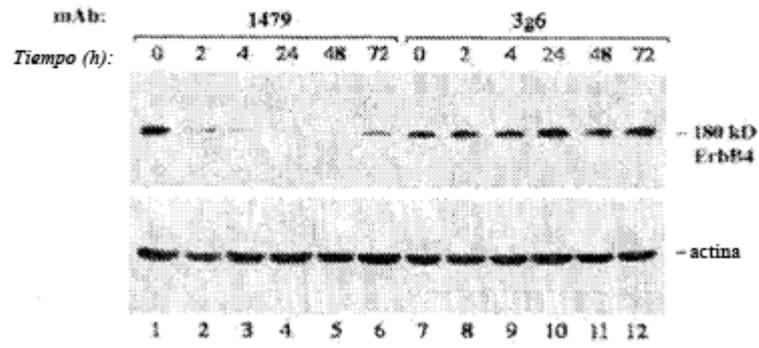


Figura 13

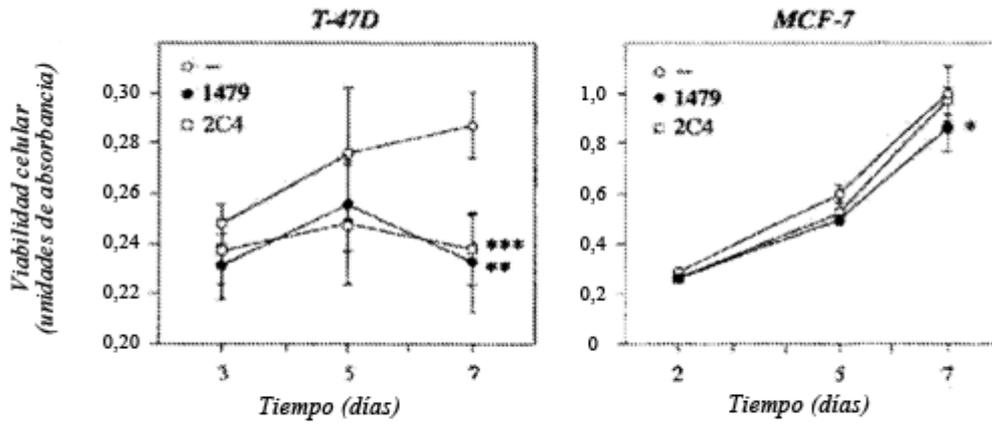


Figura 14

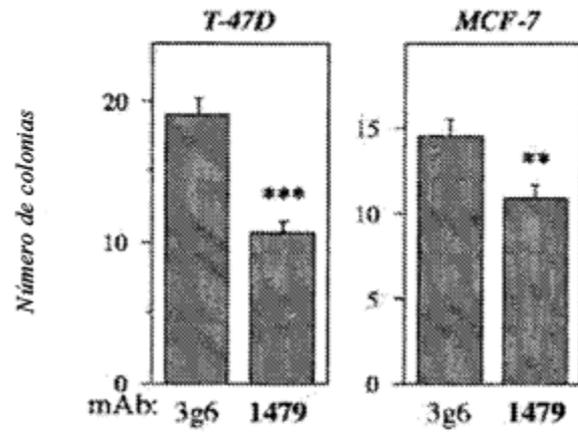


Figura 15