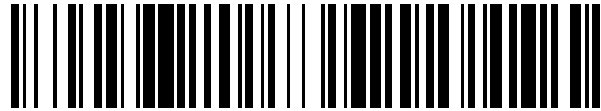


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 676**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2000 E 10010047 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2283866**

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

30 Prioridad:

**25.06.1999 US 141316 P**  
**16.03.2000 US 189844 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.05.2015**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (50.0%)**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco CA 94080-4990, US y**  
**IMMUNOGEN, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 536 676 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

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

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a métodos de tratamiento, especialmente terapias contra el cáncer dirigidas a receptores ErbB, utilizando conjugados de anticuerpo anti-receptor ErbB-maitansinoide, y artículos de fabricación adecuados para utilizar en dicho métodos.

**Descripción de la técnica relacionada**15 **1. Maitansina y maitansinoides**

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

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

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

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

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

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

65

Se han descrito otros anticuerpos anti-ErbB2 con diversas propiedades en Tagliabue *et al.*, *Int. J. Cancer*, 47:933-937 (1991); McKenzie *et al.*, *Oncogene*, 4:543-548 (1989); Maier *et al.*, *Cancer Res.*, 51:5361-5369 (1991); Bacus *et al.*, *Molecular Carcinogenesis*, 3:350-362 (1990); Stancovski *et al.* *PNAS (USA)*, 88:8691-8695 (1991); Bacus *et al.*, *Cancer Research*, 52:2580-2589 (1992); Xu *et al.*, *Int. J. Cancer*, 53:401-408 (1993); el documento WO94/00136; Kasprzyk *et al.*, *Cancer Research*, 52:2771-2776 (1992); Hancock *et al.*, *Cancer Res.*, 51:4575-4580 (1991); Shawver *et al.*, *Cancer Res.*, 54:1367-1373 (1994); Arteaga *et al.*, *Cancer Res.*, 54:3758-3765 (1994); Harwerth *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:15160-15167 (1992); la patente de EEUU n.º 5.783.186; y Klapper *et al.*, *Oncogene*, 14:2099-2109 (1997).

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

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

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

### 3. Conjugados de maitansinoide-anticuerpo

En un intento para mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides han sido conjugados con anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides se describen, por ejemplo, en las patentes de EEUU n.ºs 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1, las descripciones de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:8618-8623 (1996) describen inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado es muy citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas, y muestra actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, *Cancer Research*, 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjuga a través de un enlazador de disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno sobre líneas de células de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino, TA.1, que se une al oncogén *neu/HER2*. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea de células de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa  $3 \times 10^5$  antígenos de la superficie de HER2 por célula. El conjugado de fármaco logró un grado de citotoxicidad similar al del fármaco de maitansinoide libre, que puede aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide muestra una baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Aunque HERCEPTIN® es un importante avance en el tratamiento de pacientes con cánceres de mama que sobreexpresan ErbB2 que han recibido una extensa terapia anticáncer previa, en general aproximadamente 85% de

los pacientes en esta población no responden, o responden muy mal, al tratamiento con HERCEPTIN®, y en el ensayo clínico anterior al permiso de comercialización, la mediana del tiempo hasta el avance de la enfermedad en todos los pacientes tratados fue solo de 3,1 meses. Por tanto, existe una significativa necesidad clínica de desarrollar otras terapias para el cáncer dirigidas a HER2 para los pacientes con tumores que sobreexpresan HER2 u otras enfermedades asociadas con la expresión de HER2 que no responden, o responden muy mal, a un tratamiento con HERCEPTIN®.

Descripción resumida de la invención

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

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de un tumor en un mamífero, en el que el tumor se caracteriza por la sobreexpresión de un receptor ErbB y no responde o responde muy mal a un tratamiento con un anticuerpo anti-ErbB monoclonal, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado del anticuerpo anti-ErbB con un maitansinoide.

En una realización preferida, el paciente es humano. En otra realización preferida, el receptor ErbB es ErbB2 (HER2) humano. El método no se limita por el mecanismo de acción del anticuerpo anti-ErbB utilizado. De este modo, el anticuerpo anti-ErbB puede tener, por ejemplo, propiedades inhibitoras del crecimiento y/o puede inducir la muerte celular y/o la apoptosis. En una realización particularmente preferida, el método se refiere al tratamiento del cáncer, que incluye, sin limitación, cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, colorrectal, tiroides, pancreático, próstata y vejiga. Preferiblemente, el cáncer es cáncer de mama, en particular cáncer de mama que sobreexpresa ErbB2 a un nivel 2+ o superior, más preferiblemente a un nivel 3+. Un grupo preferido de anticuerpos tiene una característica biológica de un anticuerpo monoclonal 4D5, o se une esencialmente al mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal 4D5, siendo particularmente preferida una forma humanizada del anticuerpo monoclonal murino 4D5 (ATCC CRL 10463).

El maitansinoide utilizado en los conjugados de la presente invención puede ser maitansina o, preferiblemente, maitansinol o un éster de maitansinol. El anticuerpo y el maitansinoide se pueden conjugar mediante un enlazador químico biespecífico, tal como N-succinimidil-4-(2-piridiltio)propanoato (SPDP) o N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP). El grupo de enlace entre el anticuerpo y el maitansinoide puede ser, por ejemplo, un grupo difulfuro, tioéter, lábil a ácido, fotolábil, lábil a peptidasa o lábil a esterasa.

En otro aspecto, la invención se refiere a un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un conjugado anticuerpo anti-ErbB-maitansinoide, y que comprende además un prospecto o etiqueta que indica que la composición se puede utilizar para tratar el cáncer caracterizado por la sobreexpresión de un receptor ErbB, preferiblemente a un nivel 2+ o superior.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la estructura del maitansinoide denominado "DM1".  
 La figura 2 ilustra la estructura de un conjugado de HERCEPTIN®-DM1.  
 La figura 3 es el perfil de elución del conjugado de HERCEPTIN®-DM1 sobre una columna de filtración en gel de Sephacryl S300.  
 La figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos de una construcción de plásmido con el transgén HER2 (SEQ ID NO:1) que dirige la expresión de HER2 humano nativo (ErbB2) en la glándula mamaria de un ratón transgénico. La figura incluye la secuencia de nucleótidos del inserto de ADNc de HER2 (ErbB2) (SEQ ID NO:2), así como la secuencia de aminoácidos deducida de HER2 (ErbB2) (SEQ ID NO:3), que incluye la secuencia señal. Dentro de SEQ ID NO:3, los restos desde aproximadamente 22 hasta aproximadamente 645, ambos inclusive, representan el dominio extracelular de HER2 (ErbB2).  
 La figura 5 ilustra el efecto de HERCEPTIN®-DM1 sobre tumores HER2-transgénicos. Se trasplantaron trozos de 2 mm<sup>3</sup> de tumores MMTV-HER2-transgénicos hacia la almohadilla de grasa mamaria de ratones FVB. Cuando los tumores alcanzaron 250 mm<sup>3</sup>, grupos de 8 ratones fueron inyectados i.v. en 5 días consecutivos con un conjugado de HERCEPTIN®-DM1. Otros dos grupos de ratones fueron tratados i.p. dos veces semanales con 10 mg/kg de HERCEPTIN® o RITUXAN®.  
 La figura 6 muestra la secuencia de la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-HER2 humanizado 2C4.  
 La figura 7 muestra la secuencia de la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-HER2 humanizado 2C4.

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención (Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, N.Y., 1994).

Los expertos en la técnica reconocerán muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria que pueden utilizarse en la práctica de la presente invención. En efecto, la presente invención no se limita de ningún modo a los métodos y los materiales descritos. Para los objetivos de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos y expresiones.

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

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

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

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

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

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

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

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

Un "ligando de ErbB" significa un polipéptido que se une y/o activa un receptor ErbB. El ligando de ErbB de interés concreto en la presente memoria es un ligando de ErbB humano de secuencia nativa, tal como el factor del crecimiento epidérmico (EGF) (Savage *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 247:7612-7621 (1972)); el factor del crecimiento transformante-alfa (TGF-alfa) (Marquardt *et al.*, *Science*, 223:1079-1082 (1984)); la anfirregulina, también conocida como factor del crecimiento autocrino de queratinocitos o schwannoma (Shoyab *et al.*, *Science*, 243:1074-1076 (1989); Kimura *et al.*, *Nature*, 348:257-260 (1990); y Cook *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 11:2547-2557 (1991)); la betacelulina (Shing *et al.*, *Science*, 259:1604-1607 (1993); y Sasada *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190:1173 (1993)); el factor del crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) (Higashiyama *et al.*, *Science*, 251:936-939 (1991)); la epirregulina (Toyoda *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:7495-7500 (1995); y Komurasaki *et al.*, *Oncogene*, 15:2841-2848 (1997)), una herregulina (véase a continuación); la neurregulina-2 (NRG-2) (Carraway *et al.*, *Nature*, 387:512-516 (1997)); la neurregulina-3 (NRG-3) (Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:9562-9567 (1997)); o cripto(CR-1) (Kannan *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272(6):3330-3335 (1997)). Los ligandos de ErbB que se unen a EGFR incluyen EGF, TGF-alfa, anfirregulina, betacelulina, HB-EGF y epirregulina. Los ligandos de ErbB que se unen a HER3 incluyen herregulinas. Los ligandos de ErbB capaces de unirse a HER4 incluyen betacelulina, epirregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3 y herregulinas.

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

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

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

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

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

Un cáncer que "sobreexpresa" un receptor ErbB es un cáncer que tiene niveles significativamente mayores de un receptor ErbB, tal como HER2, en la superficie de sus células, comparado con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Esta sobreexpresión puede estar provocada por una amplificación de genes o por una mayor transcripción o traducción. La sobreexpresión del receptor ErbB puede ser determinada en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando unos mayores niveles de la proteína de ErbB presente sobre la superficie de una célula (por ejemplo, a través de un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). Como alternativa, o además, se pueden medir los niveles de ácidos nucleicos que codifican ErbB en la célula, por ejemplo, a través de hibridación *in situ* fluorescente

(FISH, véase el documento WO98/45479, publicado en octubre, 1998), análisis de la transferencia Southern, o técnicas de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), tales como una PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión del receptor ErbB midiendo el antígeno desprendido (por ejemplo, el dominio extracelular de ErbB) en un fluido biológico, tal como suero (véase, por ejemplo, la patente de EEUU n.º 4.933.294, expedida el 12 de junio, 1990; el documento WO91/05264, publicado el 18 de abril, 1991; la patente de EEUU n.º 5.401.638, expedida el 28 de marzo, 1995; y Sias *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 132: 73-80 (1990)). Además de los anteriores ensayos, los expertos en la técnica pueden utilizar diversos ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células en el paciente, por ejemplo, mediante barrido externo para detectar radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Los tumores que sobreexpresan HER2 se clasifican mediante puntuaciones inmunohistoquímicas que se corresponden con el número de copias de moléculas de HER2 expresadas por célula, y esto puede realizarse de modo bioquímico: 0 = 0-10.000 copias/célula, 1+ = al menos aproximadamente 200.000 copias/célula, 2+ = al menos aproximadamente 500.000 copias/célula, 3+ = al menos aproximadamente 2.000.000 copias/célula. La sobreexpresión de HER2 al nivel 3+, que conduce a una activación independiente del ligando de la tirosina quinasa (Hudziak *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7159-7163 (1987)), se produce en aproximadamente 30% de los cánceres de mama y, en estos pacientes, la supervivencia sin recaída y la supervivencia global son menores (Slamon *et al.*, *Science*, 244:707-712 (1989); Slamon *et al.*, *Science*, 235: 177-182 (1987)).

A la inversa, un cáncer que "no se caracteriza por la sobreexpresión de un receptor ErbB" es un cáncer que, en un ensayo de diagnóstico, no expresa unos niveles mayores que los niveles normales de receptores ErbB, comparados con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido.

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

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

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

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

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferiblemente

su región variable o de unión al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; dímeros; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de un fragmento o fragmentos de anticuerpos.

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

10 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor son reemplazados por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tenga la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región de marco (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentren en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más la actuación del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y generalmente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), generalmente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

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

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

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

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

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

65



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

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

Los "anticuerpos nativos" normalmente son glicoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, y el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados a intervalos regulares. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V<sub>H</sub>), seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene en un extremo un dominio variable (V<sub>L</sub>) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos aminoácidos concretos forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

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

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

Un anticuerpo "aislado" es un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que pueden interferir con los usos de diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo estará purificado (1) hasta más del 95% en peso del anticuerpo, según se determina mediante el método de Lowry, y lo más preferiblemente en más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o internos mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante

SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, normalmente el anticuerpo aislado preparará mediante al menos una etapa de purificación.

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

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

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

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

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

Una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) que "induce la muerte celular" es una molécula que hace que una célula viable se convierta en no viable. La célula, en general, es una célula que expresa el receptor ErbB2, en especial si la célula sobreexpresa el receptor ErbB2. Preferiblemente, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas, próstata o vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. La muerte celular *in vitro* puede determinarse en ausencia del complemento y células efectoras inmunológicas para distinguir la muerte celular inducida por la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Así, el ensayo para la muerte celular

puede realizarse utilizando suero termoinactivado (es decir, en ausencia del complemento) y en ausencia de células efectoras inmunológicas. Para determinar si la molécula es capaz de inducir la muerte celular, puede evaluarse la pérdida de la integridad de las membranas mediante la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (véase Moore *et al.*, *Cytotechnology*, 17:1-11 (1995)) o 7AAD, con relación a las células no tratadas. Los anticuerpos inductores de la muerte celular preferidos son los anticuerpos que inducen la captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474. Los ejemplos de anticuerpos que inducen la muerte celular incluyen los anticuerpos anti-ErbB2 7C2 y 7F3 (documento WO 98/17797 incorporado expresamente en el presente documento por referencia), que incluyen sus variantes humanizados y/o madurados por afinidad.

Una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) que "induce la apoptosis" es una molécula que induce la muerte celular programada, según se determina mediante la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, el encogimiento de las células, la dilatación del retículo endoplásmico, la fragmentación de las células y/o la formación de vesículas de membranas (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula normalmente es una célula que sobreexpresa el receptor ErbB2. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas, próstata o vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. Están disponibles diversos métodos para evaluar los acontecimientos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, puede medirse la translocación de la fosfatidil serina (PS) mediante la unión de anexina; la fragmentación del ADN puede evaluarse mediante la formación de escaleras de ADN; y la condensación de cromatina/nuclear, junto con la fragmentación del ADN, puede evaluarse mediante un aumento en las células hipodiploides. Preferiblemente, la molécula que induce la apoptosis es una molécula que produce un aumento en aproximadamente 2 a 50 veces, preferiblemente en aproximadamente 5 a 50 veces, y lo más preferiblemente en aproximadamente 10 a 50 veces de la inducción de la unión de anexina, con relación a una célula no tratada en un ensayo de unión de anexina que emplea células BT474. A veces, la molécula preapoptótica será una molécula que también bloquea la activación por ligando de ErbB de un receptor ErbB. En otras situaciones, la molécula es una molécula que no bloquea significativamente la activación por ligando de ErbB de un receptor ErbB. Además, la molécula puede inducir la apoptosis, sin inducir una gran reducción en el porcentaje de células en fase S (por ejemplo, una molécula que solo induce aproximadamente 0-10% de reducción en el porcentaje de estas células con relación a un control). Los ejemplos de anticuerpos que inducen la apoptosis incluyen los anticuerpos anti-ErbB2 7C2 y 7F3 (documento WO 98/17797 incorporado expresamente en el presente documento por referencia), que incluyen sus variantes humanizadas y/o maduradas por afinidad.

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

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

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

superficie de partículas de fagos (bancos de fagos). Como alternativa, puede ensayarse un banco definido de fragmentos de péptidos solapantes para la unión a un anticuerpo de ensayo en ensayos de unión simples. Esta última estrategia es adecuada para definir epitopos lineales de aproximadamente 5 a 15 aminoácidos.

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

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

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

El "epitopo 7C2/7F3" es la región en el N-terminal del dominio extracelular de ErbB2 a la cual se unen los anticuerpos 7C2 y 7F3 (cada uno depositado en ATCC, véase a continuación). Para seleccionar anticuerpos que se unen al epitopo 7C2/7F3, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado habitual, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse un cartografiado de epitopos para establecer si el anticuerpo se une al epitopo 7C2/7F3 sobre ErbB2 (por ejemplo, cualquier resto o restos en la región desde aproximadamente el resto 22 a aproximadamente el resto 53 de ErbB2; véase la figura 4, y SEQ ID NO:3).

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

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

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

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco que es eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; puede reducir el tamaño del tumor; puede inhibir (es decir, frenar en

alguna medida y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas hacia órganos periféricos; puede inhibir (es decir, frenar en alguna medida y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; puede inhibir, en alguna medida, el crecimiento tumoral; y/o puede aliviar en alguna medida uno o más síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, este puede ser

5

El término "agente citotóxico", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen sus fragmentos y/o variantes.

10

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; gases mostaza, tales como clorambucilo, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicin, detorrubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomycin, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiofanol, mepitiofanol, testolactona; antiadrenales, tales como aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; reponedores del ácido fólico, tales como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfomitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidamina; mitoguanina; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziuona; 2,2',2'-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; el inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromataza, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

20

25

30

35

40

45

50

55

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

El término "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, cuando resulte apropiado, ácido ribonucleico (ARN). La expresión también incluye, como equivalentes, análogos de ADN o ARN

60

65

preparados a partir de análogos de nucleótidos, y según sea aplicable, polinucleótidos monocatenarios (sentido o antisentido) y bicatenarios. Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta de la que tiene la forma o el emplazamiento en los que encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácidos nucleicos aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el anticuerpo en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

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

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

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

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

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

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "transgén" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es parcial o totalmente heteróloga, es decir, extraña, para la célula o el animal transgénico en la que se introduce, o es homóloga con un gen endógeno de la célula o el animal transgénico en la que se introduce, pero está diseñada para ser insertada, o se inserta en el genoma del animal de tal forma que altera el genoma de la célula en la que se

inserta (por ejemplo, se inserta en una localización diferente de la del gen natural o su inserción da como resultado una inactivación). Un transgén puede estar unido operablemente a una o más secuencias reguladoras de la transcripción y cualquier otro ácido nucleico, tales como intrones, que puedan ser necesarios para la expresión óptima de un ácido nucleico seleccionado.

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

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

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

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

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

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

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

65 2. Descripción detallada

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

Por consiguiente, la presente invención se basa en el uso de conjugados anticuerpo anti-ErbB-maitansinoide en el tratamiento de tumores que sobreexpresan ErbB que no responden bien al tratamiento con anticuerpo anti-ErbB y/o maitansinoide.

#### A. Producción de anticuerpos anti-ErbB

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

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

##### (i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales preferiblemente se generan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con una proteína que sea inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o un inhibidor de tripsina de soja, empleando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzóil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico,  $\text{SOCl}_2$ , o  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , en el que R y  $\text{R}^1$  son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, los conjugados inmunogénicos o los derivados combinando, por ejemplo, 100 g o 5 g de la proteína o el conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales reciben un refuerzo de 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante una inyección subcutánea en múltiples sitios. De 7 a 14 días después, los animales se sangran y el suero se ensaya para la titulación de anticuerpos. Los animales reciben un refuerzo hasta que la titulación alcanza un valor de meseta. Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de entrecruzamiento diferente. Los conjugados también pueden prepararse en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, de forma adecuada, se emplean agentes agregantes, tales como alumbre, para potenciar la respuesta inmunológica.

##### (ii) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en pequeñas cantidades. Así, el adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (patente de EEUU n.º 4.816.567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedante apropiado, tal como un hámster, se inmuniza tal como se describió anteriormente en la presente memoria, para inducir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos después se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).



Las células de hibridomas preparadas de esta forma se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma de origen no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma de origen carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), evitando estas sustancias el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son las células que se fusionan con eficacia, mantienen una producción estable de alto nivel del anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Entre estas, las líneas de células de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11, disponibles en the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EEUU, y células SP-2 o X63-Ag8-653 cells, disponibles en the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EEUU. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); y Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

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

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

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se separan de modo adecuado del medio de cultivo, fluido de ascitis, o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla con facilidad y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas oligonucleotídicas que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma actúan como fuente preferida de dicho ADN. Tras haber sido aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedantes, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que, en otros casos, no producen proteínas de anticuerpos, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedantes recombinantes. Los artículos científicos sobre la expresión recombinante de ADN que codifica el anticuerpo en bacterias incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993); y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

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

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

Generalmente, estos polipéptidos que no son inmunoglobulinas tienen una sustitución de los dominios constantes de un anticuerpo, o tienen una sustitución de los dominios variables de un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo, para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de unión al antígeno que tiene especificidad

por un antígeno y otro sitio de unión al antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

(iii) *Anticuerpos humanizados*

5 En la técnica se han descrito métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que es no humana. Estos restos aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos "de importación", y se obtienen generalmente de un dominio variable "de importación". La humanización puede realizarse fundamentalmente siguiendo el método de Winter *et al.* (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias de la región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, estos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EEUU n.º 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados generalmente son anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y probablemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

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

También es importante que los anticuerpos que se van a humanizar mantengan una alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias de origen y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias de origen y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulinas tridimensionales están disponibles con facilidad y son conocidos por los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. El estudio de estos modelos permite el análisis del papel probable que desempeñan los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata a unirse a su antígeno. De esta forma, pueden seleccionarse y combinarse restos de FR procedentes de secuencias del receptor y de importación, de modo que se logra la característica del anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están implicados directamente, y de modo más sustancial, en influir en la unión al antígeno.

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

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

(iv) *Anticuerpos humanos*

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

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

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

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

#### (v) Fragmentos de anticuerpos

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

#### (vi) Anticuerpos biespecíficos

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

En la técnica se conocen métodos para la preparación de anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es algo incómoda, y los rendimientos del producto son bajos. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991). Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de unión al antígeno-anticuerpo) se condensan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulinas. La fusión preferiblemente se realiza con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que la primera

región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera esté presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulinas y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo hospedante adecuado. Esto proporciona una mayor flexibilidad para  
 5 ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en los casos en los que proporciones no iguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificadoras de dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en proporciones iguales produzca unos rendimientos altos o cuando las proporciones no tengan una importancia particular.

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

20 Según otra estrategia descrita en la patente de EEUU n.º 5.731.168, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos puede modificarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio C<sub>H3</sub> de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo son reemplazadas por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar al de la cadena o cadenas laterales más grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para  
 25 aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

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

40 Avances recientes han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden ser acoplados de modo químico para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpo biespecífico completamente humanizada. Cada fragmento Fab' es segregado por separado desde *E. coli* y sometido a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera es capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y a células T humanas normales, así como puede activar la actividad lítica de  
 45 linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

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

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

(vii) Otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos

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

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

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

Otro tipo de variante es un variante de sustitución de aminoácidos. Estos variantes tienen al menos un resto aminoácido en la molécula del anticuerpo anti-ErbB2 reemplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la tabla 1 bajo el encabezamiento de "Sustituciones preferidas". Si estas sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "Ejemplos de sustituciones" en la tabla 1, o como se describe más a fondo a continuación con respecto a las clases de aminoácidos, y los productos pueden seleccionarse.

Tabla 1

Resto original	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Se logran unas modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que se diferencien significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura del

esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal; (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o (c) la voluminosidad de la cadena lateral. Los restos que aparecen en la naturaleza se dividen en grupos basados en sus propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

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

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

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

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

Para aumentar la semivida sérica del anticuerpo se puede incorporar un epitopo de unión al receptor de salvamento en el anticuerpo (de modo específico, un fragmento de anticuerpo) según se describe en la patente de EEUU n.º 5.739.277, por ejemplo. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "epitopo de unión al receptor de salvamento" se refiere a un epitopo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, o IgG<sub>4</sub>) que es responsable de aumentar la semivida sérica *in vivo* de la molécula de IgG.

#### (viii) Variantes de glicosilación

Los anticuerpos se glicosilan en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, *Chem. Immunol.*, 65:111-128 (1997); Wright y Morrison, *TibTECH*, 15:26-32 (1997)). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd *et al.*, *Mol. Immunol.*, 32:1311-1318 (1996); Wittwe y Howard, *Biochem.*, 29:4175-4180 (1990)), y a la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína que puede afectar a la conformación y la superficie tridimensional presentada de la glicoproteína (Hefferis y Lund, *supra*; Wyss y Wagner, *Current Opin. Biotech.*, 7:409-416 (1996)). Los oligosacáridos también pueden actuar para transportar una glicoproteína concreta hasta ciertas moléculas basándose en estructuras de reconocimiento específicas. Por ejemplo, se ha indicado que, en IgG agalactosilado, el resto oligosacárido "se voltea" hacia fuera del espacio inter-CH<sub>2</sub> y los restos N-actilglucosamina terminales se hacen disponibles para

unirse a la proteína de unión a manosa (Malhotra *et al.*, *Nature Med.*, 1:237-243 (1995)). La eliminación por glicopeptidasa de los oligosacáricos de CAMPATH-1H (un anticuerpo IgG1 monoclonal murino humanizado recombinante que reconoce el antígeno CDw52 de linfocitos humanos) producido en células de ovario de hámster chino (CHO) produce una reducción completa en la lisis mediada por el complemento (CMCL) (Boyd *et al.*, *Mol. Immunol.*, 32:1311-1318 (1996)), mientras que la eliminación selectiva de restos ácido siálico utilizando neuraminidasa no produce pérdida de DMCL. También se ha indicado que la glicosilación de anticuerpos afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se ha indicado que células CHO con expresión regulada por tetraciclina de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una formación catalizada por glicosiltransferasa de GlcNAc biseccionante, tienen mayor actividad ADCC (Umana *et al.*, *Mature Biotech.*, 17:176-180 (1999)).

La glicosilación de anticuerpos se realiza generalmente de modo N-enlazado u O-enlazado. N-enlazado se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un resto asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación O-enlazada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, de forma más habitual serina o treonina, aunque también pueden utilizarse 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina.

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

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

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

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

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

*(viii) Selección de anticuerpos con las propiedades deseadas*

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

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

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

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

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

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

65 Por ejemplo, la inhibición de la unión de HRG a líneas de células de tumor de mama MCF7 por anticuerpos anti-ErbB2 puede realizarse utilizando cultivos en monocapa de MCF7 sobre hielo en un formato de placa de 24 pocillos fundamentalmente como se describe en el siguiente ejemplo 1. Pueden añadirse anticuerpos monoclonales anti-



ErbB2 a cada pocillo e incubar durante 30 minutos. Entonces puede añadirse rHRG 1<sub>177-224</sub> marcado con <sup>125</sup>I (25 pm), y la incubación puede continuar durante 4 a 16 horas. Pueden prepararse curvas de dosis-respuesta y puede calcularse un valor de CI<sub>50</sub> para el anticuerpo de interés. En un caso, el anticuerpo que bloquea la activación por ligando de un receptor ErbB tendrá una CI<sub>50</sub> para la inhibición de la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menor, más preferiblemente 10 nM o menor. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab, la CI<sub>50</sub> para la inhibición de la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menor, más preferiblemente de 50 nM o menor.

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

En una realización, se puede seleccionar un anticuerpo que inhiba la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina de p180 en células MCF7. Por ejemplo, las células MCF7 pueden cultivarse en placas de 24 pocillos y pueden añadirse anticuerpos monoclonales contra ErbB2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente; después puede añadirse rHRG 1<sub>177-224</sub> a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM, y la incubación puede continuar durante 8 minutos. El medio puede aspirarse de cada pocillo y las reacciones pueden detenerse mediante la adición de 100 l de tampón de muestra de SDS (SDS al 5%, DTT 25 mM, y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25 l) puede someterse a una electroforesis sobre un gradiente de gel del 4-12% (Novex) y después transferirse electroforéticamente a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno). Pueden revelarse las inmunotransferencias de antifosfotirosina (a 1 g/ml), y puede cuantificarse la intensidad de la banda reactiva predominante a M<sub>r</sub> aproximadamente 180.000 mediante densitometría de reflectancia. El anticuerpo seleccionado preferiblemente inhibe significativamente la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina de p180 en aproximadamente 0-35% del control en este ensayo. Puede prepararse una curva de dosis-respuesta para la inhibición de la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina de p180, según se determina mediante densitometría de reflectancia, y puede calcularse una CI<sub>50</sub> para el anticuerpo de interés. En un caso, el anticuerpo que bloquea la activación por ligando de un receptor ErbB tendrá una CI<sub>50</sub> para la inhibición de la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina de p180 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menor, más preferiblemente de 10 nM o menor. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab, la CI<sub>50</sub> para la inhibición de la estimulación por HRG de la estimulación de la fosforilación de la tirosina de p180 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menor, más preferiblemente de 50 nM o menor.

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

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

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

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

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

Se preparan conjugados de anticuerpo anti-ErbB-maitansinoide mediante el enlace químico de un anticuerpo anti-

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

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

Los conjugados de anticuerpo y maitansinoide pueden prepararse utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutarealdehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, *Biochem. J.*, 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

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

#### D. Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones terapéuticas de los conjugados de anticuerpo-maitansinoide utilizados según la presente invención para su conservación, mezclando un anticuerpo que tenga el grado deseado de pureza con vehículos, diluyentes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A., ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; fenol, butil o bencil alcohol; alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menores que aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN, PLURONICS o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones de anticuerpos anti-ErbB2 liofilizadas preferidas se describen en el documento WO 97/04801, incorporada expresamente en el presente documento por referencia

Las formulaciones de la presente memoria también pueden contener más de un compuesto activo, según sea necesario para la indicación concreta que se esté tratando, preferiblemente los que tienen actividad complementaria que no afecten de modo adverso a los demás. Por ejemplo, puede resultar deseable proporcionar también anticuerpos o conjugados de anticuerpo-maitansinoide que se unen a EGFR, ErbB2 (por ejemplo, un anticuerpo que se une a un epitopo diferente sobre Erb2), ErbB3, ErbB4, o el factor endotelial vascular (VEGF) en una sola formulación. Como alternativa, o además, la composición también puede comprender un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal y/o un cardioprotector. Estas moléculas están presentes, de modo adecuado, en combinación en unas cantidades que son eficaces para los objetivos previstos.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Osol, A.,

ed. (1980).

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

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

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

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

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

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

- Puntuación 0: no se observa tinción o se observa tinción de las membranas en menos del 10% de las células tumorales.
- Puntuación 1+: se detecta una tinción de las membranas tenue/apenas perceptible en más del 10% de las células tumorales; las células solo se tiñen en parte de sus membranas.
- Puntuación 2+: se observa una tinción completa de las membranas de débil a moderada en más del 10% de las células tumorales.
- Puntuación 3+: se observa una tinción completa de las membranas de moderada a fuerte en más del 10% de las células tumorales.

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

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

En una realización, el cáncer será un cáncer que expresa (y puede sobreexpresar) EGFR. Los ejemplos de cánceres que pueden expresar/sobreexpresar EGFR incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer renal o de riñón,

cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

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

10 El tratamiento de la presente invención se dirige a tumores que sobreexpresan ErbB que no responden, o que responden muy mal, a un tratamiento con un anticuerpo anti-ErbB no conjugado. Estos pacientes pueden haber recibido un tratamiento previo con un anticuerpo anti-ErbB no conjugado con un resto maitansinoide, en el que el tratamiento previo puede no haber producido una mejora significativa, o haya producido una respuesta transitoria. Sin embargo, el tratamiento previo de cualquier paciente concreto con un anticuerpo anti-ErbB no conjugado no es un prerrequisito para identificar pacientes que sean candidatos para un tratamiento según la presente descripción.

15 Cualquier médico puede identificar con facilidad pacientes que se espera que se beneficien de un tratamiento con los inmunoconjugados de la presente invención basándose en datos clínicos disponibles al público o su propia experiencia. El tratamiento de mamíferos, y en particular de pacientes humanos, con o sin un tratamiento previo con un anticuerpo anti-ErbB (no conjugado) se encuentra específicamente dentro del alcance de la presente invención.

20 Los conjugados de anticuerpo anti-ErbB-maitansinoide se administran a un mamífero, preferiblemente a un paciente humano, según métodos conocidos, tales como la administración intravenosa, por ejemplo, como una inyección en embolada o mediante infusión continua, a lo largo de un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo.

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

30

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

35

40

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

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

55

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

65

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

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

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

## 25 **F. Artículos manufacturados**

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

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

65

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

5 Se produjo el anticuerpo monoclonal murino 4D5 que se une específicamente al dominio extracelular de ErbB2 según se describe en Fendly *et al.*, *Cancer Research*, 50:1550-1558 (1990). Brevemente, células NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub> (que expresan aproximadamente  $1 \times 10^5$  moléculas de ErbB2/célula) producidas según se describe en Hudziak *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84:7158-7163 (1987) se recolectaron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene EDTA 25 mM y se utilizaron para inmunizar ratones BALB/c. Los ratones recibieron inyecciones i.p. de  $10^7$  células en 0,5 ml de PBS en las semanas 0, 2, 5 y 7. Los ratones con antisuero que inmunoprecipitó ErbB2 marcado con <sup>32</sup>P recibieron inyecciones i.p. de un extracto de membranas de ErbB2 purificado con aglutinina de trigo (WGA)-Sepharose en las semanas 9 y 13. A esto le siguió una inyección i.v. de 0,1 ml de la preparación de ErbB2, y los esplenocitos se fusionaron con la línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653. Los sobrenadantes de los hibridomas se seleccionaron para la unión a ErbB2 mediante ELISA y radioinmunoprecipitación.

**Cartografiado y caracterización de epitopos**

20 Se determinó el epitopo de ErbB2 unido por el anticuerpo monoclonal 4D5 mediante un análisis de unión competitiva (Fendly *et al.*, *Cancer Research*, 50:1550-1558 (1990)). Se realizaron estudios de bloqueo cruzado por fluorescencia directa sobre células intactas utilizando la máquina de selección PANDEX™ Screen Machine para cuantificar la fluorescencia. El anticuerpo monoclonal se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (FITC), utilizando procedimientos establecidos (Wofsy *et al.*, *Selected Methods in Cellular Immunology*, p. 287, Mishel y Schiigi (eds.), San Francisco, W.J. Freeman Co. (1980)). Las monocapas confluentes de células NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub> se tripsinizaron, se lavaron una vez y se resuspendieron a  $1,75 \times 10^6$  células/ml en PBS frío que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5% y NaN<sub>3</sub> al 0,1%. Se añadió una concentración final de partículas de látex al 1% (IDC, Portland, OR) para reducir la coagulación de las membranas de la placa PANDEX™. Se añadieron 20 l de células en suspensión y 20 l de anticuerpos monoclonales purificados (de 100 g/ml a 0,1 g/ml) a los pocillos de la placa PANDEX™ y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se añadió una dilución predeterminada del anticuerpo monoclonal marcado con FITC en 20 l a cada pocillo, se incubó durante 30 minutos, se lavó y se cuantificó la fluorescencia mediante PANDEX™. Se consideró que los anticuerpos monoclonales compartían un epitopo si cada uno bloquea la unión del otro en 50% o mayor, en comparación con un anticuerpo monoclonal control irrelevante. En este experimento, se asignó el epitopo I al anticuerpo monoclonal 4D5 (restos aminoácidos desde aproximadamente 529 a aproximadamente 625, ambos inclusive, dentro del dominio extracelular de ErbB2 (véase SEQ ID NO:3)).

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

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

55 Las células MCF7 se cultivaron en placas de 24 pocillos y se añadieron anticuerpos monoclonales contra ErbB2 a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente; después se añadió rHRG 1<sub>177-244</sub> a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM, y la incubación continuó durante 8 minutos. El medio se aspiró cuidadosamente de cada pocillo y las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100 l de tampón de muestra de SDS (SDS al 5%, DTT 25 mM, y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25 l) se sometió a una electroforesis sobre un gel con gradiente del 4-12% (Novex), y después se transfirió electroforéticamente a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno). Se revelaron las inmunotransferencias de antifosfotirosina (4G10, de UBI, utilizada a 1 g/ml) y se cuantificó la intensidad de la banda reactiva predominante a Mr 180.000 mediante densitometría de reflectancia, según se ha descrito previamente (Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205-1210 (1992); Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:14661-14665 (1994)).

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

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

### **Humanización**

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

### **Ejemplo 2**

#### **Conjugados de HERCEPTIN®-DM1**

##### **1. Purificación de HERCEPTIN®**

Se disuelve HERCEPTIN® (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, patente de EEUU n.º 5.821.337) (1 vial que contiene 440 mg de anticuerpo) en 50 ml de tampón MES (MES 25 mM, NaCl 50 mM, pH 5,6). La muestra se carga sobre una columna de intercambio catiónico (Sephacrose S, 15 cm x 1,7 cm) que ha sido equilibrada en el mismo tampón. La columna también se lava con el mismo tampón (5 volúmenes de columna). Se eluye el HERCEPTIN® aumentando la concentración de NaCl en el tampón hasta 200 mM. Las fracciones que contienen el anticuerpo se reúnen, se diluyen hasta 10 mg/ml y se dializan en un tampón que contiene fosfato de potasio 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5.

##### **2. Modificación de HERCEPTIN® con SPP**

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

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

El anticuerpo modificado (337,0 mg, 9,5 µmol de grupos 2-tiopiridina liberables) se diluyó con el anterior tampón citrato de sodio 35 mM, pH 6,5, hasta una concentración final de 2,5 mg/ml. Entonces se añadió DM1 (cuya estructura se muestra en la figura 1) (1,7 equivalentes, 16,1 µmol) en dimetilacetamida 3,0 mM (DMA, al 3% en v/v en la mezcla de reacción final) a la disolución de anticuerpo. La reacción se desarrolla a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón durante 20 horas. La estructura de los conjugados de HERCEPTIN®-DM1 se ilustra en la figura 2.

La reacción se carga sobre una columna de filtración en gel de Sephacryl S300 (5,0 cm x 90,0 cm, 1,77 l) equilibrada con citrato de sodio 35 mM, NaCl 154 mM, pH 6,5. El caudal es de 5,0 ml/min y se recogen 65 fracciones (20,0 ml cada una). Un pico principal se centra alrededor de la fracción n.º 47 (figura 3). El pico principal comprende HERCEPTIN®-DM1 monomérico. Se reúnen las fracciones 44-51 y se ensayan. Se determina el número de moléculas del fármaco DM1 unidas por molécula de anticuerpo midiendo la absorbancia a 252 y 280 nm, y se descubre que es de 3,7 moléculas de fármaco por molécula de anticuerpo.

### **Ejemplo 3**

**Animales transgénicos**

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

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

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

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

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

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

El tratamiento de ratones que portan tumores con HERCEPTIN® o 4D5, el anticuerpo murino a partir del cual se deriva el HERCEPTIN® humanizado, solo produce un efecto modesto sobre el crecimiento de los tumores transplantados (figura 5). La expresión de HER2 fue de 3+ en tumores que crecieron durante la terapia con



HERCEPTIN® o 4D5, lo cual indica que no existe selección de tumores HER2-negativos. Además, se detectó cy3-HERCEPTIN® decorando las células tumorales después de la inyección en ratones que portan tumores, lo cual indica que la falta de eficacia no fue debida a la incapacidad del anticuerpo para acceder al tumor.

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

Depósito del material biológico

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

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

25 Este depósito se realizó según las disposiciones de the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure y las regulaciones allí expuestas (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de cultivos viables durante 30 años desde la fecha del depósito. El ATCC puede suministrar los organismos bajo los términos del Tratado de Budapest, y sometido a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura una disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie de los  
 30 cultivos al público tras la expedición de la pertinente patente de EEUU o tras abrir al público cualquiera de las solicitudes de patente de EEUU o de otro país, cualquiera que sea la primera, y asegura la disponibilidad de la progenie para aquellos que the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks determine que tenga derecho a ello, según 35 USC §122 y las normas de dicho comisiario conformes a ello (que incluye 37 CFR §1.12 con particular referencia a 886 OG 638).

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

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

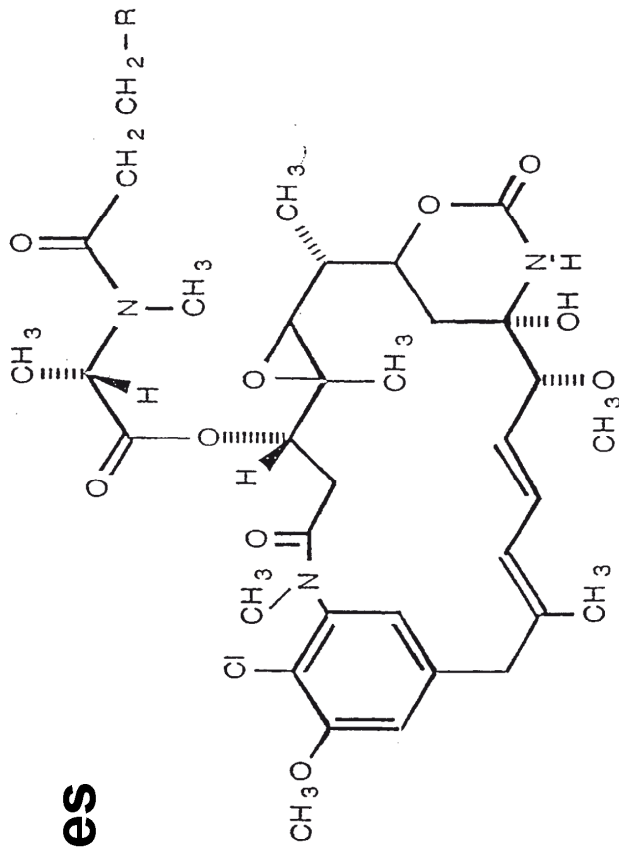
45 La anterior memoria descriptiva escrita se considera suficiente para que los expertos en la técnica practiquen la invención. La presente invención no se ve limitada en su alcance por las construcciones depositadas, puesto que se pretende que las realizaciones depositadas solo ilustren ciertos aspectos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

55 Se entiende que la aplicación de las indicaciones de la presente invención a un problema o situación específicos está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica a la luz de las indicaciones contenidas en la presente memoria.

**REIVINDICACIONES**

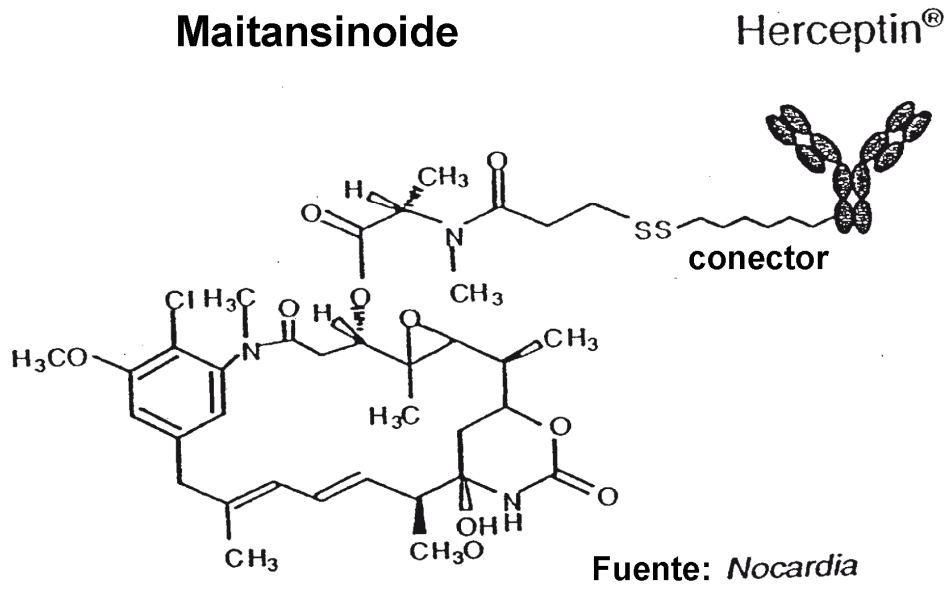
- 5 1. Conjugado huMAb4D5-8(Herceptin<sup>®</sup>)-maitansinoide, conjugado de fragmento de anticuerpo huMAb4D5-8 que se une a antígeno-maitansinoide, o una formulación farmacéutica que comprende dicho conjugado huMAb4D5-8(Herceptin<sup>®</sup>)-maitansinoide o un conjugado de fragmento de anticuerpo huMAb4D5-8 que se une a antígeno-maitansinoide, para utilizar en un método de tratamiento de un tumor, en el que el tumor se **caracteriza por** la sobreexpresión de ErbB2 y no responde o responde mal al tratamiento con huMAb4D5-8(Herceptin<sup>®</sup>).
- 10 2. Conjugado, según la reivindicación 1, o formulación farmacéutica, según la reivindicación 1, para utilizar en dicho método de tratamiento de un tumor, en el que el maitansinoide es maitansina, maitansinol o un éster de maitansinol.
3. Conjugado, según la reivindicación 1 ó 2, o formulación farmacéutica, según la reivindicación 1 ó 2, para utilizar en dicho método de tratamiento de un tumor, en el que el maitansinoide es DM1.
- 15 4. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o formulación farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para utilizar en dicho método de tratamiento de un tumor, en el que se utiliza un segundo anticuerpo anti-ErbB2 en dicho método de tratamiento de un tumor.
- 20 5. Conjugado, según la reivindicación 4, o formulación farmacéutica, según la reivindicación 4, para utilizar en dicho método de tratamiento de un tumor, en el que el segundo anticuerpo anti-ErbB2 es un anticuerpo que bloquea la activación de ligando de ErbB2.
- 25 6. Conjugado, según la reivindicación 4, o formulación farmacéutica, según la reivindicación 4, para utilizar en dicho método de tratamiento de un tumor, en el que el segundo anticuerpo anti-ErbB2 es 2C4 humanizado (ATCC HB-12697).
- 30 7. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o formulación farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para utilizar en dicho método de tratamiento de un tumor, en el que el cáncer **se caracteriza por** la sobreexpresión del receptor ErbB2 en un nivel 2+ o superior.
- 35 8. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o formulación farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para utilizar en dicho método de tratamiento de un tumor, en el que el cáncer es un cáncer de mama.

**Maitansinoides**  
( DM1 )



**Figura 1**

Figura 2



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

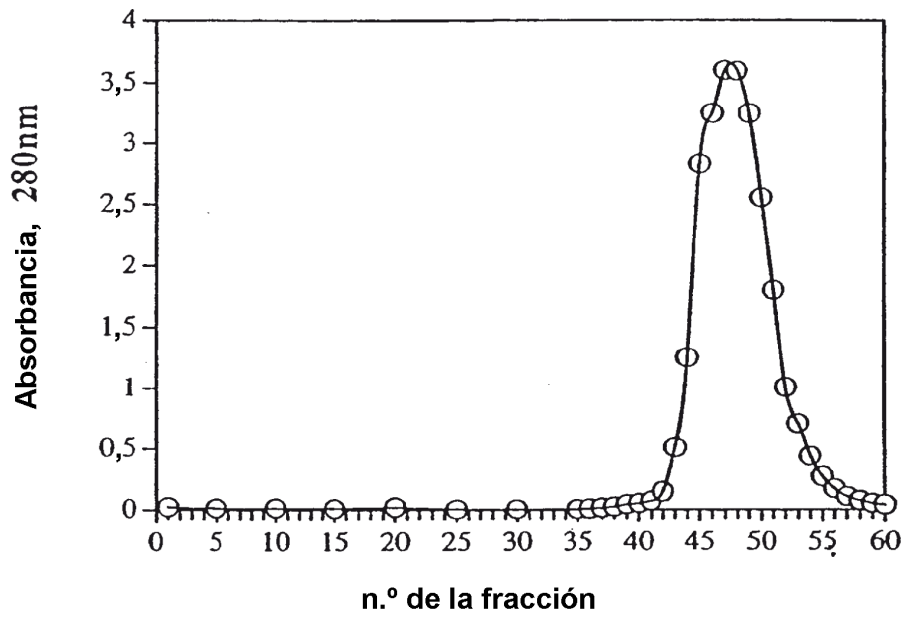


Figura 4

```

sau3AI          hgiAI/aspHI      sau3AI      rmaI
mboI/ndeII     mboI/ndeII     maeI
dPnII bsp1286  dpnII   rneI      nlaIII tseI      rmaI
                dpnI cac8I tseI      sphI  fnu4HI/bsOfI  maeI
pvuI/bspCI     mseI  nlaIII·thai cac8I nspHI  bsvI      bfai
mcrI  bsiHKAI  tsp509I  fnuDII/mvnl cac8I scfI      styI
bsiEI  bmyI  aseI/asnI/vspI  bstUI·bfai aluI nspI  pstI      bsaJI
taqI  apaLI/snoI  rcaI  bsh1236I fnu4HI/bsOfI cac8I blnI
aluI dpnI alw44I/snoI  bspHI nruI aluI bbvI cac8I bsgI  avrII
1 AAGCTCGATC GGTGCACATT AATTCATGAT CGCGAGCTAG CAGCTTGCAT GCCTGCAGCA GAAATGGTTG AACTCCCGAG AGTGCCCTAC ACGTAGGGGA
  TTCGAGCTAG CCACGGTAA TTAAGTACTA GCGCTGCATC CTCGACGTA CGSAGCTCGT CTTTACCAAC TTGAGGGCTC TCACAGGATG TGGATCCCTC
  ^ inicio del conector 1      ^ fin del conector 1      ^ inicio del promotor MMTV

                styI          hgiJII
                bsaJI          bsp1286
                tseI          hinPI
                fnu4HI/bsOfI  hhaI/cfoI
                bbvI          mstI
                styI  bcgI      avIII/ispI  foki
                bsaJI ahdI/eam1105I  bstf5I
101 GAAGCAGCCA AGGGTTTGT TCCCACCAAG GAGGACCGT CTGGCCACAA ACCGATGAGC CCATCAGACA AAGCATATT CATTCTCTGC TGCAAACTTG
    CTTCTGCGGT TCCCACCAAA AGGGTGGTC CTGCTGGGCA GACGGTGT TCCCTACTCG GGTAGTCTGT TTCTGTATAA GTAAGAGACG ACCTTGAAC

                mwoI          hgiJII
                cac8I          hgiJII
                hgiAI/aspHI      mboII
                bsp1286          bsp1286      earI/ksp632I
                bsiHKAI          bmyI          pleI  tru9I sapi      manI
                aciI  bmyI          banII hphI  hinfi  mseI aluI      bsaBI
                aluI          mwoI          accI  bmyI          accCTTGACT ACCCTTGACT CTTTTAATAG CTCCTTCTGT CAAGATTACA
201 GCATAGCTCT GCTTTGCTGG GGCATTGGGG GAAGTTGGGG TTCGTGCTCG CAGGGCTCTC ACCCTTGACT CTTTTAATAG CTTCTTCTGT CAAGATTACA
    CGTATCGAGA CGAAACGACC CCGTAACCCC CTTCAACCCC AAGCAGGACC GTCCCCGAGG TGGGAACCTGA GAAAATTATC GAGAAGACAC GTTCTAATGT

```

clai/bsp105  
 bspDI  
 sfani  
 mnlI sau96I  
 ddel avall  
 eco8II asuI  
 tsp509I taqI mnlI mnlI mnlI fnu4HI/bsOFI eco57I  
 301 ATCTAAACAA TTCGGAGAAC TCGACCTTCC TCTCCTGAGG CAAGGACCAC AGCCAACCTC CTCTTACAAG CCGCATCGAT TTTGTCTCTC AGAAATAGAA  
 TAGATTTGTT AAGCCCTTTG AGCTGGNAGG AGAGGACTCC GTTCTCTGCTG GAGAAATGTTT GGCCTAGCTA AAACAGGAAG TCCTTTATCTT  
 cac8I  
 bsmI tsp509I  
 401 ATAAGNATGC TTGCTAAAAA TTATATTTTT ACCAATAAGA CCAATCCAAAT AGGTAGAITA TTAGTTACTA TGTAAAGAAA TGAATCATAA TCCTTTAGTA  
 TATCTTAGC AAGGATTTTT AATATAAAAA TGGTATTCTT GGTAGGTTA TCCATCTAAT AATCAATGAT ACAATTCCTT ACTTAGTAAT AGAAATCAT  
 hgaI  
 esp3I tsp509I haeII  
 bsmBI mnlI/mfeI stuI  
 bsmAI mnlI mboII haeI  
 501 CTATTTTTAC TCAATTCAG AAGTTAGAAA TGGGAATAGA AAATAGAAAAG AGACGCTCAA CCTCAATTGA AGAACAGGTG CAAGGACTAT TGACCACAGG  
 GATAAAAAATG AGTTTAAAGC TTCAATCTTT ACCCTTATCT TTTATCTTTC TCTGGAGTTT GGAGTTAACT TCTTGTCCAC GTTCTCTGATA ACTGGTGTCC  
 rmaI bsmFI  
 maeI scrFI sau96I  
 bfaI mvaI avall  
 601 CCTAGNAGTA AAAAAGGAA AAAAGAGTGT TTTTGTCAA ATAGAGACA GGTGGTGGA ACCAGGGACT TATAGGGGAC CTTCATCTA CAGACCAACA  
 GGATCTTCAT TTTTCCCTT TTTTCTACA AAAACAGTTT TATCTCTGT CCACCACCGT TGGTCCCTGA ATATCCCTG GAAATGATAT GTCTGGTTGT  
 mnlI  
 sau3AI  
 mboI/ndeII  
 dpnII  
 dpnI  
 alwI  
 bstVI/xhoII  
 tsp509I  
 701 GATGCCCCC TACCATATAC AGGAAGATAT GACTTAAAT GGGATAGGTG GGTACAGTC AATGGCTATA AAGTGTATA TAGATCCCTC CCTTTTCGTG  
 CTACGGGGA ATGGTATATG TCCTTCTATA CTGAATTAA CCTATCCAC CCAATGTCAG TTACCGGAT TACCAATAT ATCTAGGGAG GGAABAGCAC

```

rmaI      styI      nlaIII      rmaI
maeI      bsajI      nlaIII      maeI
bfai      mnlI      rsaI      bfai
aluI      mnlI      csp6I      bsmI
pleI      hinfi      nlaIII      bfai
801 AAAGACTCGC CAGAGCTAGA CCTCCCTGGT GTAATGTTGC TCAAGAAGAA AAAGACGACA TGAACAACA GGTACATGAT TATATTTATC TAGGAACAGG
TTTCTGAGCG GTCTCGATCT GGAGGAACCA CATAACAACAG AGTTCTTCTT TTTCTGCTGT ACTTTGTTGT CCACTACTA ATATAAATAG ATCCTTGTC

          tspRI
          styI      alwNI
          bsli      bsmFI
          bsli bsajI mnlI alw26I/bsmAI
901 AATGCACTTT TGGGAAAGA TTTCCATAC CAAGGAGGG ACAGTGGCTG GACTAATAGA ACATTTATCT GCAAAACCTT ATGCGCATGAG TTATTATGAA
TTACGTGAAA ACCCCTTTCT AAAAGGTATG GTTCCCTCCC TGTCCACCGAC CTGATTATCT TGTATAAGA CGTTTTTGAA TACCGTACTC AATAATACTT

          tru9I
sau96I    styI      msel      fokI
haeIII/palI nlaIV   smlI      bstF5I
asul      aciI   bsajI aflII/bfrI maeIII   mnlI      bsmAI
1001 TAGCCTTAT TGGCCCAACC TTGCGGTCC CAAGCCTTAA GTAAGTTTTT GGTACAAAC TGTTCCTAAA ACGAGGATGT GAGACAAGTG GTTTCCTGAC
ATCGGAATA ACCGGTTGG AACGCCAAGG GTTCCGAAT CAATCAAAA CCAATGTTTG ACAAGAATTT TGCTCCTACA CTCTGTTTCC CAAAGGACTG

          sstI
          sacI
          hgiJII
          hgiAI/aspHI
          eclI36II
          bspI286
          bsiHRAI
          bmyI
          ddeI
          sau3AI
          mboI/ndeII
          dpnII aluI
          dpnI banII ddeI
          tsp509I
          apoI
1101 TTGGTTTGGT ATCAAAGGTT CTGATCTGAG CTCTGAGTGT TCTATTTTCC TATGTTCTTT TGGAAATTTAT CCAAATCTTA TGTRAAATGCT TATGTRAAACC
AACCAAACCA TAGTTTCCAA GACTAGACTC GAGACTACA AGATPAAAAGG ATACAAGAAA ACCTTAATA GGTTTAGAAT ACRTTTACGA ATACATTTGG

```





fnu4HI/bsoFI  
 mCRI  
 eagi/xmaIII/ecI XI  
 eaeI  
 cfri  
 noti  
 fnu4HI/bsoFI  
 tru9I haeIII/palI tsp50  
 mseI bsiEI hindIII ecoRI  
 aluI smII acilI aluI taqI  
 apyI  
 bsli bsaJI tsp509I afIII/bfri cac8I ecoRV apoI  
 1501 CACCTAITGG TCCTACTGAC ATCCACTTGG CCTTCTCTC CACAGGTGC CACTCCAGG TTCAAATTACA GCTCTTAAGC GCCCGCAAGC TTGATATCGA  
 GTGGATRACC AGAATGACTG TAGGTGAAC GGAAGAGAG GTGTCCACAG GTGAGGGTCC AGTTAATCT CGAGAAATTCG CCGGGGTTCC AACATATAGCT  
 ^ final del intrón quimérico en pCI 989

final del inserto de BS en HindIII ^

scrFI  
 mvaI  
 ecoRII  
 dsav  
 bstNI  
 bssKI  
 apyI  
 foki  
 bstF5I  
 xmaI/pspAI  
 smaI mboI/ndeII sau3AI  
 scrFI dpnII mboI/ndeII  
 nciI dpnI  
 tsei dsav alwI rmaI alwI  
 fnu4HI/bsoFI  
 bsvI cauII nlaIV maeI nlaIV tsp509I  
 scfI bssKI bstYI/xhoII bstYI/xhoII  
 pstI bsaJI bamHI bfaI bamHI ecoRI aluI avai cac8I cauII  
 bsgI avai alwI speI alwI apoI hindIII taqI bssHII bssKI mnlI bbvI acilI acilI  
 1601 ATTCTGCGAG CCCGGGGAT CCACTAGTGG ATCCAAAGAA TTCAAAAGC TTCTCGAGG CGCGGGCCG GCCCCACACC CTCGCAGCAC CCCGCCCCC  
 TAAGGACGTC GGGCCCCCTA GGTGATCACC TAGGTTCTT AAGTTTTTCG AAGAGCTCCC CGCGCGGGC CGGGGGTGG GAGGTCGTG GGGCGGGGG  
 ^ final del inserto del intrón BS en spe  
 ^ inicio de HER2 humano desde BS en xhoI

hinPI  
 hhaI/cfoI  
 thaI  
 fnuDII/mvnI  
 bstUI  
 bsh1236I  
 mwoI sau96I  
 hinPI mspI  
 hhaI/cfoI  
 cac8I hpaII  
 bssHI nlaIV  
 thaI scrFI  
 fnuDII/mvnI  
 mnlI bstUI nciI  
 xhoI bsh1236I haeIII/palI  
 smI hinPI dsav mwoI bstUI bstUI  
 paer7I hhaI/cfoI asuI tsei bsh1236I  
 aluI avai cac8I cauII fnu4HI/bsoFI bsh12  
 hindIII taqI bssHII bssKI mnlI bbvI acilI acilI

```

sau96I          hgiAI/aspHI
avaII           bsp1286
asuI            bsiHKAI
nlaIV          hpaII   cac8I
scrFI          nlaIV   hpaII   cac8I
ncII           hgiJII   thai
mspI           nciI    fnuDII/mvnI
hpaII         dsav    bstUI mslI
dsav          cauII   bsh1236I
mnlI          mspAI/nspBI mnlI   bssKI aciI bmyI
mwoI          fnu4HI/bsoFI aciI bmyI bseRI
hinPI         mspI   bstXI cac8I haeIII/palI banII mnlI
hhaI/cfoI     bssKI   hpaII bsaJI aluI aciI   fnu4HI/bsoFI bseRI mnlI
1701 GCGCCCTCCC AGCCGGGTCC AGCCGGGTCC CGGCCTTGTG CGCCTGGGG CTCCTCTCTCG CCTCTTTGCC CCCCAGGCC GCGAGCACCC
CGCCGGAGGG TCGGCCCTCG TACCTCGACC GCCGGAACAC GCGGACCCCG GAGGAGGACC GGGAGAACGG GGGGCTCGG CGCTCGTGGG
M E L A A L C R W G L L L A L L P P G A A S T Q
1
mspI          scrFI
cfr10I/bsrFI fnu4HI/bsoFI
hgiAI/aspHI  fnu4HI/bsoFI
bsp1286      aciI
bsiHKAI      mslI    bsmAI
bmyI hpaII   tseI    bsaI
apaII/snoI   fnu4HI/bsoFI bsmFI
alw44I/snoI aluI    nlaIII bbvI nlaIV bsrI avai
1801 AAGTGTGCAC CGGCACAGAC ATGAAGCTGC GGCTCCCTGC CAGTCCCGAG ACCCACCTGG ACATGCTCCG CCACCTCTAC CAGGGCTGCC AGGTGGTGCA
TTCACACGTG GCCGTGCTG TACTTCGAGC CCGAGGACG GTCAGGGCTC TGGGTGGACC TGTACGAGCC GGTGGAGATG GTCCCGACGG TCCACCACGT
25 V C T G T D M K L R L P A S P E T H L D M L R H L Y Q G C Q V V Q
mspI          scrFI
cfr10I/bsrFI fnu4HI/bsoFI
hgiAI/aspHI  fnu4HI/bsoFI
bsp1286      aciI
bsiHKAI      mslI    bsmAI
bmyI hpaII   tseI    bsaI
apaII/snoI   fnu4HI/bsoFI bsmFI
alw44I/snoI aluI    nlaIII bbvI nlaIV bsrI avai
1801 AAGTGTGCAC CGGCACAGAC ATGAAGCTGC GGCTCCCTGC CAGTCCCGAG ACCCACCTGG ACATGCTCCG CCACCTCTAC CAGGGCTGCC AGGTGGTGCA
TTCACACGTG GCCGTGCTG TACTTCGAGC CCGAGGACG GTCAGGGCTC TGGGTGGACC TGTACGAGCC GGTGGAGATG GTCCCGACGG TCCACCACGT
25 V C T G T D M K L R L P A S P E T H L D M L R H L Y Q G C Q V V Q
mnlI          scrFI
hgiAI/aspHI  bsp1286
bsiHKAI      bmyI
bstNI        dsav
bssKI        bstNI   tseI
apyl         bsmAI   bsaI
hphI         bspMI   cac8I
1901 GGGAAACCTG GAACTCACCT ACCTGCCAC CAATGCCAGC CTGTCTTCC TGACAGGATAT CCAGGAGGTT CAGGGCTACG TGCTCATCGC TCACAACCAA
CCCTTTGGAC CTTGAGTGA TGGAGGGTG GTTACGGTGC GACAGGAGG ACCTCCTATA GGTCCTCCAC GTCCCGATGC ACCGATGCG AGTGTGGTT
58 G N L E L T Y L P T N A S L S F L Q D I Q E V Q G Y V L I A H N Q

```



```

hinPI
hhai/cfoi
thai
fnuDII/mvni
bstUI
mwoI bsh1236I mspi
hpaiI mwoI
cfr10I/bsrFI
GCTGCCACC CCTGTTCTCC GATGTGTAAG GGCTCCCGCT GCTGGGAGA GAGTCTGAG GATTGTAGA GCTGAGCGG CACTGTCTGT GCGGGTGGCT
CGGACGGTGG GGACAAGAGG CTACACATTC CCGAGGCGA CGACCCCTCT CTCAAGACTC CTACAGTCT CGACTGCGC GTACAGACA CGGCCACCGA
191 A C H P C S P M C K G S R C W G E S S E D C Q S L T R T V C A G G C
mspAlI/nspBII
mwoI tsei
nlaIV fnu4HI/bsOFI
hgiJII bsII
bsp1286 bbvI
bmyI acII
banII bsII
mnlI
ddei
alwNI hgai
alw26I/bsmAI tspRI
mwoI bsh1236I mspi
hpaiI mwoI
cfr10I/bsrFI
GCTGCCACC CCTGTTCTCC GATGTGTAAG GGCTCCCGCT GCTGGGAGA GAGTCTGAG GATTGTAGA GCTGAGCGG CACTGTCTGT GCGGGTGGCT
CGGACGGTGG GGACAAGAGG CTACACATTC CCGAGGCGA CGACCCCTCT CTCAAGACTC CTACAGTCT CGACTGCGC GTACAGACA CGGCCACCGA
191 A C H P C S P M C K G S R C W G E S S E D C Q S L T R T V C A G G C
cac8I
tsei
fnu4HI/bsOFI
mspAlI/nspBII
bsII
aciI
cac8I
bsp1286
bmyI bbvI
nlaIV
nlaIV
nlaIII tspRI
tspRI
haeIII/pali
sau96I
asui
nlaIV
nlaIII
CAAGGGCCA CTGCCACTG ACTGCTGCCA TGAGCAGTGT GCTCCCGGT GCACGGCCC CAACACTCT GACTGCCGTG CCGCCCTCCA
CACGGCGAC GTTCCCGGT GACGGTGCAC TGACGACGGT ACTCGTCACA CGACGGCCA CCGTCCCGG GTTCGTGAGA CTGACGGACC GGACGGAGT
2401 GTGCCCGTGT CAAGGGCCA CTGCCACTG ACTGCTGCCA TGAGCAGTGT GCTCCCGGT GCACGGCCC CAACACTCT GACTGCCGTG CCGCCCTCCA
CACGGCGAC GTTCCCGGT GACGGTGCAC TGACGACGGT ACTCGTCACA CGACGGCCA CCGTCCCGG GTTCGTGAGA CTGACGGACC GGACGGAGT
225 A R C K G P L P T D C C H E Q C A A G C T G P K H S D C L A C L H

```

```

                bstEII
scrFI          bstZ17I
mvaI          mspI
ecorIII       sau96I bst1107I
dsaV          mnlI hpaII
                bsII haeIII/palI
                bsaJI cfr10I/bsrFI
                maeII pleI
                afIII hinfi nlaIII
                avai asuI accI
                aGTTGCTCT GTGCAAACTC AGGTACGGGT TAGGGCTCCC GGCATATGT
                L V T Y N T D T F E S M P N P E G R Y T
                2501 CTTCAACCAC AGTGGCATCT GTGAGCTGCA CTGCCAGCC CTGGTCACTT ACAACACAGA CAGGTTGAG TCCATGCCCA ATCCCGAGGG CCGGTATACA
                GRAAGTTGGTG TCACCGTAGA CACTCGACGT GACGGGTGGG GACCAGTGGA TGTTGCTCT GTGCAAACTC AGGTACGGGT TAGGGCTCCC GGCATATGT
                258 F N H S G I C E L H C P A L V T Y N T D T F E S M P N P E G R Y T
cac8I
hinPI
hhaI/cfoI
nlaIV
nari
kasi
hinII/acyI
hgiCI
haeII aluI ahdI/eam1105I
ehel pvuII tsp45I
bani mspAlI/nspBII
ahaII/bsaHI maeIII
ahII/bsaHI maeIII bsmFI
TTCGGCGGCA GCTGTGTGAC TGCCTGTCCC TACAACCTACC TTCTTACCGA CGTGGATCC TGCACCCCTCG TCTGCCCCCT GCACAACCAA GAGGTGACAG
AAGCCCGGT CGACACTG ACGCACAGG ATGTTGATGG AAAGATGCCT GCACCTAGG ACCTGGGAGC AGACGGGGGA CGTGTGGTT CTCCACTGTC
291 F G A S C V T A C P Y N Y L S T D V G S C T L V C P L H N Q E V T A
                foki          aciI          avai          bsmFI          mnlI
                bstF5I       mspAlI/nspBII   fnu4HI/bsofI bsp1286   maeII alwI   mnlI
                mnlI         mslI           bbvI         bmyI           nlaIII       hpaII
                CAGAGGATGG AACACACGGG TGTGAGAACT GCAGCAGCC CTGTGCCCGA GTGTGCTATG GTCTGGGCAT GGAGCACTTG CGAGAGGTGA GGGCAGTTAC
                GTCTCCCTACC TTGTGTGCGC ACACTCTTCA CGTCGTTCGG GACACGGGCT CACACGATAC CAGACCCGTA CCTCGTGAAC GCTCTCCACT CCCGTCAATG
                325 E D G T Q R C E K C S K P C A R V C Y G L G M E H L R E V R A V T
                hgiAI/aspHI
                bsp1286
                bsiHKAI
                bmyI
                hpaII
                mnlI mnlI maeIII
                bsrI
                bmyI
                nlaIII
                hpaII
                mnlI mnlI maeIII
                CGAGAGGTGA GGGCAGTTAC
                CCTCGTGAAC GCTCTCCACT CCCGTCAATG
                E H L R E V R A V T
    
```

sau96I  
 nlaIV  
 avaiI  
 asuI  
 sanDI  
 ppuMI  
 nlaIV  
 ecoO109I/draII  
 bsmFI  
 mnlI  
 tspRI  
 2801 CAGTGGCAAT ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTCTT GCCGGAGACC TTTGATGGG ACCCAGCCCTC CAACACTGCC  
 GTCACGGTTA TAGTCTCTCA AACGACCGAC GTTCTTCTAG AACCCCTCG ACCGTAAGA CGCCCTCTCG AAACCTACCC TGGGTGGAG GTTGTGACGG  
 358 S A N I Q E F A G C K K I F G S L A F L P E S F D G D P A S N T A  
  
 xcmI  
 scrFI  
 mvaI  
 ecoRII  
 dsav  
 bstNI  
 bssKI  
 apyI  
 2801 CAGTGGCAAT ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTCTT GCCGGAGACC TTTGATGGG ACCCAGCCCTC CAACACTGCC  
 GTCACGGTTA TAGTCTCTCA AACGACCGAC GTTCTTCTAG AACCCCTCG ACCGTAAGA CGCCCTCTCG AAACCTACCC TGGGTGGAG GTTGTGACGG  
 358 S A N I Q E F A G C K K I F G S L A F L P E S F D G D P A S N T A  
  
 sau3AI  
 scrFI  
 mvaI  
 ecoRII  
 dsav  
 bstVI/xhoII  
 bstNI  
 bssKI  
 apyI  
 2801 CAGTGGCAAT ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTCTT GCCGGAGACC TTTGATGGG ACCCAGCCCTC CAACACTGCC  
 GTCACGGTTA TAGTCTCTCA AACGACCGAC GTTCTTCTAG AACCCCTCG ACCGTAAGA CGCCCTCTCG AAACCTACCC TGGGTGGAG GTTGTGACGG  
 358 S A N I Q E F A G C K K I F G S L A F L P E S F D G D P A S N T A  
  
 mspI  
 hpaII  
 haeIII/palI  
 eaeI  
 cfrI  
 ddeI nlaIII cac8I  
 drdI hgaI  
 2901 CCGCTCCAGC CAGAGCAGCT CCAAGTGTTT GAGACTGTGG AAGAGATCAC AGGTTACCTA TACATCTCAG CATGGCCCGA CAGCCTGCCT GACCTCAGCG  
 GCGGAGTCC GTCTCGTCCA GGTTCACAAA CTCAGAGACC TTCCTAGTG TCCATGGAT ATCTAGATC GTACCGCCT GTCCGACGGA CTGGAGTCCG  
 391 P L Q P E Q L Q V F E T L E E I T G Y L Y I S A W P D S L P D L S V  
  
 alwNI  
 alw26I/bsmAI  
 mboII  
 bspMI  
 3001 TCTTCCAGAA CCTGCAAGTA ATCCGGGAC GAATCTGCA CAATGCGCC TACTCGCTGA CCCTGCAAGG GCTGGGCATC AGCTGGCTGG GGCTGCGCTC  
 AGAAGGTCTT GGACGTTTCT TAGGCCCTG CTTAAGAGCT GTTACCGCGG ATGAGGCACT GGGACGTTCC CGACCCGTTAG TCGACCGACC CCGACCGCAG  
 425 F Q N L Q V I R G R I L H N G A Y S L T L Q G L G I S W L G L R S  
  
 bpmI/gsuI  
 tseI  
 fnu4HI/bsuFI  
 aciI mwoI  
 bbvI  
 2801 CAGTGGCAAT ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTCTT GCCGGAGACC TTTGATGGG ACCCAGCCCTC CAACACTGCC  
 GTCACGGTTA TAGTCTCTCA AACGACCGAC GTTCTTCTAG AACCCCTCG ACCGTAAGA CGCCCTCTCG AAACCTACCC TGGGTGGAG GTTGTGACGG  
 358 S A N I Q E F A G C K K I F G S L A F L P E S F D G D P A S N T A  
  
 pleI  
 hinFI  
 bsmAI  
 earI/ksp632I  
 bstEII  
 2801 CAGTGGCAAT ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTCTT GCCGGAGACC TTTGATGGG ACCCAGCCCTC CAACACTGCC  
 GTCACGGTTA TAGTCTCTCA AACGACCGAC GTTCTTCTAG AACCCCTCG ACCGTAAGA CGCCCTCTCG AAACCTACCC TGGGTGGAG GTTGTGACGG  
 358 S A N I Q E F A G C K K I F G S L A F L P E S F D G D P A S N T A  
  
 hinPI  
 hhaI/cfoI  
 nlaIV  
 naxI  
 kasi  
 hinII/acyI  
 hgiCI  
 haeII  
 eheI  
 bani  
 ahaII/bsaHI mwoI  
 bsII  
 2801 CAGTGGCAAT ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTCTT GCCGGAGACC TTTGATGGG ACCCAGCCCTC CAACACTGCC  
 GTCACGGTTA TAGTCTCTCA AACGACCGAC GTTCTTCTAG AACCCCTCG ACCGTAAGA CGCCCTCTCG AAACCTACCC TGGGTGGAG GTTGTGACGG  
 358 S A N I Q E F A G C K K I F G S L A F L P E S F D G D P A S N T A  
  
 bsmFI  
 scrFI  
 nciI  
 mspI  
 hpaII  
 dsav  
 cauII  
 bssKI  
 bsaJI  
 apoI  
 2801 CAGTGGCAAT ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTCTT GCCGGAGACC TTTGATGGG ACCCAGCCCTC CAACACTGCC  
 GTCACGGTTA TAGTCTCTCA AACGACCGAC GTTCTTCTAG AACCCCTCG ACCGTAAGA CGCCCTCTCG AAACCTACCC TGGGTGGAG GTTGTGACGG  
 358 S A N I Q E F A G C K K I F G S L A F L P E S F D G D P A S N T A  
  
 tsp509I  
 ecoRI  
 apoI  
 2801 CAGTGGCAAT ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTCTT GCCGGAGACC TTTGATGGG ACCCAGCCCTC CAACACTGCC  
 GTCACGGTTA TAGTCTCTCA AACGACCGAC GTTCTTCTAG AACCCCTCG ACCGTAAGA CGCCCTCTCG AAACCTACCC TGGGTGGAG GTTGTGACGG  
 358 S A N I Q E F A G C K K I F G S L A F L P E S F D G D P A S N T A  
  
 hinPI  
 hhaI/cfoI  
 cac8I  
 pvuII  
 tseI  
 mspAI/nspBII  
 fnu4HI/bsuFI  
 sfanI aluI mwoI  
 bbvI  
 tspRI  
 3001 TCTTCCAGAA CCTGCAAGTA ATCCGGGAC GAATCTGCA CAATGCGCC TACTCGCTGA CCCTGCAAGG GCTGGGCATC AGCTGGCTGG GGCTGCGCTC  
 AGAAGGTCTT GGACGTTTCT TAGGCCCTG CTTAAGAGCT GTTACCGCGG ATGAGGCACT GGGACGTTCC CGACCCGTTAG TCGACCGACC CCGACCGCAG  
 425 F Q N L Q V I R G R I L H N G A Y S L T L Q G L G I S W L G L R S

```

sau96I
avaII
asuI
nlaIV
scrFI
draIII mvaI
mwoI bsp1286 bsmFI
bstAPI bmyI ecorII
hgiAI/aspHI dsaV
bsp1286 nlaIV bstNI
bsiHKAI hgiCI bssKI
bmyI bani bsaJI
apaII/snoI apyI
alw44I/snoI bsaJI aluI nlaIV acii
mnlI
sau96I fokI
haeIII/palI
asuI bstF5I
mnlI
dseI bsrI tspRI mnlI
3101 ACTGAGGGAA CTGGGAGTG GACTGGCCT CATCCACCAT AACACCCACC TCCTCTTGGT GCACACGGTG CCCTGGGACC AGCTCTTTTCG GAACCCGCAC
TGACTCCCTT GACCCCTCAC CTGACCCGGA GTAGGTGTA TTGTGGGTGG AGACGACCA CGTGTGCCAC GGGACCTTGG TCGAGAAAGC CTGGGGGTG
458 L R E L G S G L A L I H H N T H L C F V H T V P W D Q L F R N P H
sau96I
pspO
nlaIV
hgiJ
bspI:
bmyI
bani:
scrFI
mvaI
ecorII
dsaV
bstNI
bssKI
bsaJI
apyI
sau96I
avaII
asuI
apaII
nlaIV
ecolI
TGGGTCCAG
TCCCGACG ACCCCAGTC
491 Q A L L H T A N R P E D E C V G E G L A C H Q L C A R G H C W G P G

```

cambio de secuencia de Coussens a Yamamoto ^



```

scrFI
mvaI
ecorII
dsav
bstNI
bssKI
mwoI
tsei
fnu4HI/bsOFI
bbvI
scfI
psti
bsgi
asui
bsri
hincII/hindII
drailI
sau96I
haeIII/pali
asui
bsri
hincII/hindII
tspRI
pali
bstAPI
alwNI
alw26I/bsmAI
340I CAGGCACGTG TTGCCGTGCC ACCCTGAGTG TCAGCCCCAG AATGGCTCAG TGACCTGTTT TGGACCGGAG GCTGACCAGT GTGTGGCTG TGCCCACTAT
GTCCGTGACA AACGGCAGG TGGACTCAC AGTCGGGTC TTACCGACTC ACTGGACAAA ACCTGGCTC CGACTGGTCA CACACCGGAC ACGGTGATA
558 R H C L P C H P E C Q P Q N G S V T C F G P E A D Q C V A C A H Y
tspRI
mwoI
bstAPI
alwNI
alw26I/bsmAI
340I CAGGCACGTG TTGCCGTGCC ACCCTGAGTG TCAGCCCCAG AATGGCTCAG TGACCTGTTT TGGACCGGAG GCTGACCAGT GTGTGGCTG TGCCCACTAT
GTCCGTGACA AACGGCAGG TGGACTCAC AGTCGGGTC TTACCGACTC ACTGGACAAA ACCTGGCTC CGACTGGTCA CACACCGGAC ACGGTGATA
558 R H C L P C H P E C Q P Q N G S V T C F G P E A D Q C V A C A H Y
tsei
mwoI
fnu4HI/bsOFI
mspAII/nspBII
aciI
cac8I
sau96I
haeIII/pali
aciI
mwoI
draII
mwoI
asui
bbvI
mspAII/nspBII
ecoO109I/draII
mwoI
asui
bbvI
mspAII/nspBII
350I AAGGACCTC CCTTGTGGT GGGCCGCTGC CCCAGCGGTG TGAACCTGA CCTCTCTAC ATGCCCATCT GGAAGTTTC AGATGAGGAG GGCGCATGCC
TTCTGGGAG GGAAGACGCA CCGGGCAGG GGGTCCCCAC ACITTTGGACT GGAGAGGATG TACGGGTAGA CCTTCAAAGG TCTACTCTC CCGGTACGG
591 K D P P F C V A R C P S G V K P D L S Y M P I W K F P D E E G A C Q

```

```

scrFI
mvaI
ecorII
dsav
bstNI
bssKI
apyI
sau96I
avaII foki
asuI bstF5I
mslI
3601 AGCCTTGCCC CATCAACTGC ACCCACTCCT GTGTGGACCT GGATGACAAG GCTGCCCCG CCGAGGACAG AGCCAGCCCT CTGACGTCCA TCGTCTCTGC
TCGGAACGGG GTAGTTGACG TGGGTGAGGA CACACCTTGA CACTACTGTC CCGACGGGGC GGCTCGTCTC TCGGTGGGA GACTGCAGGT AGCAGAGACG
625 P C P I N C T H S C V D L D D K G C P A E Q R A S P L T S I V S A

tseI
fnu4HI/bsofi
bbvI aciI
cac8I mnlI eatII bsmBI aciI
3601 AGCCTTGCCC CATCAACTGC ACCCACTCCT GTGTGGACCT GGATGACAAG GCTGCCCCG CCGAGGACAG AGCCAGCCCT CTGACGTCCA TCGTCTCTGC
TCGGAACGGG GTAGTTGACG TGGGTGAGGA CACACCTTGA CACTACTGTC CCGACGGGGC GGCTCGTCTC TCGGTGGGA GACTGCAGGT AGCAGAGACG
625 P C P I N C T H S C V D L D D K G C P A E Q R A S P L T S I V S A

tail
maeiI esp3I
hinII/acyI bsmAI
ahaII/bsaHI
cac8I mnlI eatII bsmBI aciI
3601 AGCCTTGCCC CATCAACTGC ACCCACTCCT GTGTGGACCT GGATGACAAG GCTGCCCCG CCGAGGACAG AGCCAGCCCT CTGACGTCCA TCGTCTCTGC
TCGGAACGGG GTAGTTGACG TGGGTGAGGA CACACCTTGA CACTACTGTC CCGACGGGGC GGCTCGTCTC TCGGTGGGA GACTGCAGGT AGCAGAGACG
625 P C P I N C T H S C V D L D D K G C P A E Q R A S P L T S I V S A

mspI
mroI
bspMII
bspEI
bsaWI
sau3AI
mboI/ndeII
dpnII
dplI
alwI
nlaIV
bstYI/xhoII
tseI
fnu4HI/bsofi
mwoI
fnu4H
3701 GGTGGTGGC ATTCTGCTGG TCGTGGTCTT GGGGGTGGTC TTTGGATCC TCATCAAGG ACGGCAGCAG AAGATCCCGA AGTACACCAT GCGGAGACTG
CCACCACCG TAAGACGACC AGCACGAGAA CCCCCACGAG AAACCCTAGG AGRAGTTCCG TGCCGTCGTC TTCTAGGCCT TCATGTGCTA CGCCTCTGAC
658 V V G I L L V V V L G V V F G I L I K R R Q Q K I R K Y T M R R L

mnlI
sau3AI
mboI/ndeII
mami
dplII
dplI
bsaBI
alwI
nlaIV
bstYI/xhoII
bamHI
alwI
mwoI
bbvI mboII accIII csp6I sfaNI bsmAI bbvI
3701 GGTGGTGGC ATTCTGCTGG TCGTGGTCTT GGGGGTGGTC TTTGGATCC TCATCAAGG ACGGCAGCAG AAGATCCCGA AGTACACCAT GCGGAGACTG
CCACCACCG TAAGACGACC AGCACGAGAA CCCCCACGAG AAACCCTAGG AGRAGTTCCG TGCCGTCGTC TTCTAGGCCT TCATGTGCTA CGCCTCTGAC
658 V V G I L L V V V L G V V F G I L I K R R Q Q K I R K Y T M R R L

```

sau3AI  
 hinPI mboI/ndeII  
 hhaiI/cfoI dpnII  
 scrFI nlaIV  
 mvai bstVI/xhoII  
 ecorII bamHI  
 dsav acII  
 bstNI sfANI dpnI esp3I mnlI  
 bssKI mami alwI bsmBI ddeI  
 apyI bsaBI alwI bsmAI aluI hphI  
 sfANI  
 3801 CTGCAGGAAA CGGAGCTGGT GGAGCGGCTG ACACCTAGCG GACCGATGCC CAACCAGGGC CAGATCGCGA TCCTGAAAGA GACGGAGCTG AGGAAGGTGA  
 GACGTCCITT GCCTCGACCA CCTCGGGCAG TGTGGATCGC CTGGCTACGG GTTGTCCCGC GTCTACGCTT AGGACTTTCT CTGCTCGAC TCCTTCCACT  
 691 L Q E T E L V E P L T P S G A M P N Q A Q M R I L K E T E L R K V K  
  
 rmaI  
 mspAII/nspBII  
 acII maeI  
 fnu4HI/bsoFI acII  
 nlaIV bfaI  
 sfANI  
 3901 AGGTGCTGG ATCTGGCGCT TTTGGCACAG TCTACAAGG CATCTGGATC CCTGATGGGG AGAATGTGAA AATTCCAGTG GCCATCAAAG TGTGTAGGGA  
 TCCACGACC TAGACCGGGA AAACCGTGC AGATGTTCCC GTAGACCTAG GGACTACCCC TCTTACACTT TTAAGGTCCAC CGGTAGTTTC ACAACTCCCT  
 725 V L G S G A F G T V Y K G I W I P D G E N V K I P V A I K V L R E  
  
 foki  
 bstF5I  
 4001 AAACACATCC CCCAAGCCA ACAAGAAAT CTTAGACGAA GCATPCGTGA TGGTGGTGT GGGTCCCA TATGCTCCC CCCTCTGGG CATCTGCCCTG  
 TTTGTAGG GGGTTCCGT TGTTCCTTA GAATCTGCTT CGTATGCTT ACCGACCACA CCCGAGGGGT ATACAGAGGG CGGAAGACCC GTAGACGGAC  
 758 N T S P K A N K E I L D E A Y V M A G V G S P Y V S R L L G I C L  
  
 bslI  
 sau3AI  
 mboI/ndeII  
 dpnII  
 dpnI mscI/balI  
 alwI haeI  
 nlaIV eaeI  
 bstVI/xhoII tspRI  
 bamHI  
 3901 AGGTGCTGG ATCTGGCGCT TTTGGCACAG TCTACAAGG CATCTGGATC CCTGATGGGG AGAATGTGAA AATTCCAGTG GCCATCAAAG TGTGTAGGGA  
 TCCACGACC TAGACCGGGA AAACCGTGC AGATGTTCCC GTAGACCTAG GGACTACCCC TCTTACACTT TTAAGGTCCAC CGGTAGTTTC ACAACTCCCT  
 725 V L G S G A F G T V Y K G I W I P D G E N V K I P V A I K V L R E  
  
 nlaIV  
 hgiJII mwoI  
 bspI286 bslI  
 bmyI acII  
 banII ndeI bsmAI bgII sfANI  
 4001 AAACACATCC CCCAAGCCA ACAAGAAAT CTTAGACGAA GCATPCGTGA TGGTGGTGT GGGTCCCA TATGCTCCC CCCTCTGGG CATCTGCCCTG  
 TTTGTAGG GGGTTCCGT TGTTCCTTA GAATCTGCTT CGTATGCTT ACCGACCACA CCCGAGGGGT ATACAGAGGG CGGAAGACCC GTAGACGGAC  
 758 N T S P K A N K E I L D E A Y V M A G V G S P Y V S R L L G I C L

sau96I  
 scrFI avaiI  
 mvaiI asuI  
 ecorII ppuMI  
 acII dsav scrFI  
 thalI bstNI mvaiI  
 fnuDII/mvni hgiVII alwNI  
 bstUI bssKI ecorII  
 bsh1236I bsaJI dsav  
 sacII/sstII bspi286 eco0109I/draII  
 mspAII/nspBII bmyI bstNI  
 ksplI apyI nlaIV alw26I/bsmAI  
 dsalI hlnII/acyI bssKI  
 bsaJI hgalI banII apyI  
 acII ahaII/bsaHI bsaJI bspMI  
 CGGAAACC CGGACGCCT GGGCTCCCAG GACCTGCTGA  
 CGCCTTTGG CGCCTCCGGA CCCGAGGGTC CTGGACGACT  
 G R L G S Q D L L N  
 4101 ACATCCACGG TGCAGCTGGT GACACAGCTT ATGCCCTATG GCTGCCCTCTT AGACCATGTC CGGAAACC  
 TGTAGTGCC ACGTCGACCA CTGTGTCGAA TACGGGATAC CGACGGAGAA TCTGGTACAG GCCCTTTGG  
 D H V R E N R G R L G S Q D L L N  
 791 T S T V Q L V T Q L M P Y G C L L D H V R E N R G R L G S Q D L L N  
 aluI  
 pvuII tsp45I  
 mspAII/nspBII  
 tseI maeIII  
 fnu4HI/bsOFI  
 bbVI hphI aluI  
 TGCAGCTGGT GACACAGCTT ATGCCCTATG GCTGCCCTCTT AGACCATGTC CGGAAACC  
 TGTAGTGCC ACGTCGACCA CTGTGTCGAA TACGGGATAC CGACGGAGAA TCTGGTACAG GCCCTTTGG  
 D H V R E N R G R L G S Q D L L N  
 4201 ACTGGGTGAT GCAGATTGCC AAGGGATGA GCTACCTGGA GGATGTCCGG CTCGTACACA GGACTTGGC CCCTCGGAAC GTGCTGGTCA AGAGTCCCBA  
 TGACCACATA CGTCTAACGG TTCCCTACT CGATGGACCT CCTACACGCC GAGCATGTGT CCCTGAACCG GCGAGCCTTG CACGACCCAGT TCTCAGGGTT  
 W C M Q I A K G M S Y L E D V R L V H R D L A A R N V L V K S P N  
 825 W C M Q I A K G M S Y L E D V R L V H R D L A A R N V L V K S P N  
 bsrBI  
 acII  
 fnu4HI/bsOFI  
 haeIII/palI  
 eaeI  
 tail  
 maeII  
 pleI  
 hinfI  
 bsmFI  
 4301 CCATGTCAAA ATTACAGACT TCGGCTGGC TCGGCTGGC GACATTGACC AGACAGATTA CCATGCAGAT GGGGGCAAGG TGCCCATCAA GTGGATGGCG  
 GGACAGITTT TAATGCTGA AGCCGACCG AGCCGACCG CTGTAAGTGC TCTGTCTCAT GGTACGTCTA CCCCCGTCC ACGGTAGTT CACCTACCGC  
 H V K I T D F G L A R L L D I D E T E Y H A D G G K V P I K W M A  
 858 H V K I T D F G L A R L L D I D E T E Y H A D G G K V P I K W M A  
 bsp1286  
 bmyI hinPI  
 nlaIV xcmI haeII  
 hgiCI pflMI foki hhaI/cI  
 banI bslI bstF5I  
 nlaIII  
 bstXI  
 rsaI mslI  
 csp6I  
 bsmAI  
 4401 CCATGTCAAA ATTACAGACT TCGGCTGGC TCGGCTGGC GACATTGACC AGACAGATTA CCATGCAGAT GGGGGCAAGG TGCCCATCAA GTGGATGGCG  
 GGACAGITTT TAATGCTGA AGCCGACCG AGCCGACCG CTGTAAGTGC TCTGTCTCAT GGTACGTCTA CCCCCGTCC ACGGTAGTT CACCTACCGC  
 H V K I T D F G L A R L L D I D E T E Y H A D G G K V P I K W M A  
 858 H V K I T D F G L A R L L D I D E T E Y H A D G G K V P I K W M A

```

mspI
hpaII
naeI/ngoMI
cfrI0I/bsrFI
cac8I
pleI
hinfi
sgrAI
tsp4SI
maeIII
maeIII
bsp4SI
mspI
hpaII
dsav
cauII
bssKI
xmaI/pspAI
bslI
sau3AI
mboI/ndelI
dpnII
alwI
nlaIV
bstYI/xhoII
bamHI
alwI
4501 ATGGGATCCC AGCCCGGGGAG ATCCCTGACC TGCTGGAAAA GGGGAGGCGG CTGCCCCCAGC CCCCACATCTG CACCATTGAT GTCATACATGA TCATGGTCAA
TACCCTAGGG TCGGGCCCTC TAGGGACTGG ACGACTTTT CCCCTCGCC CAGGGGTCC GGGGCTAGAC GTGGTAACATA CAGATGTACT AGTACCAGIT
925 G I P A R E I P D L L E K G E R L P Q P P I C T I D V Y M I M V K

mspI
hpaII
naeI/ngoMI
cfrI0I/bsrFI
cac8I
sgrAI
acil
aciI hphI mslI
4401 CTGGAGTCCA TTCTCCCGCG CGGGTTCACC CACCAGAGTG ATGTGTGGAG TTATGGTGTG ACTGTGTGGG AGCTGATGAC TTTTGGGGCC AACCTTACG
GACCTCAGGT AAGAGGGCGG CGCCAAGTGG GTGGTCTCAC TACACACGTC AATACACACC TGACACACCC TCGACTACTG AAAACCCCGG TTTGGATGC
891 L E S I L R R R R F T H Q S D V W S Y G V T V W E L M T F G A K P Y D

scrFI
ncii
mspI
hpaII
dsav
cauII
bssKI
xmaI/pspAI
bslI
sau3AI
mboI/ndelI
dpnII
alwI
nlaIV
bstYI/xhoII
bamHI
alwI
4501 ATGGGATCCC AGCCCGGGGAG ATCCCTGACC TGCTGGAAAA GGGGAGGCGG CTGCCCCCAGC CCCCACATCTG CACCATTGAT GTCATACATGA TCATGGTCAA
TACCCTAGGG TCGGGCCCTC TAGGGACTGG ACGACTTTT CCCCTCGCC CAGGGGTCC GGGGCTAGAC GTGGTAACATA CAGATGTACT AGTACCAGIT
925 G I P A R E I P D L L E K G E R L P Q P P I C T I D V Y M I M V K

sau3AI
mboI/ndelI
dpnII
dpnI
bclI
nlaIII
accI mslI nlaIII
tseI
mwoI
fnu4HI/bsoFI
bbvI
fnu4HI/bsoFI
acil
bsrBI
bstYI/xhoII
bspMI
bstYI/xhoII
925 G I P A R E I P D L L E K G E R L P Q P P I C T I D V Y M I M V K

```

```

sau96I
sauDI
scrFI
mvaI nlaIV
ecorII
dsav avaiI
bstNI
bssKI
bsaJI
apyI asuI
haeIII/pali
msci/bali
haeI ppumi
haeI nlaIV
haeI hhai/cfoI
bsII
haeIII/pali
haeI eaeI
tsp509I
ecorI
apoI
acII cfri
bsmFI
afel/eco47III
bstF5I
foki
4601 ATGTTGGATG ATTACTCTG AATGTCGGCC AGATTCGGG GAGTTGGTGT CTGAATTCCT CCGCATGGCC AGGACCCGCC AGCGCTTGT GGTCATCCAG
TACAACCTAC TRACTGAGAC TTACAGCCGG TTCTAAGGCC CTCACCACA GACTTAAGAG GCGTACC GGCTACCGG TCCCTGGGG TCGCAACA CCAGTAGGTC
958 C W M I D S E C R P R F R E L V S E F S R M A R D P Q R F V V I Q

foki
bstF5I
4701 AATGAGGACT TGGGCCACG CAGTCCCTTG GACAGCACCT TCATCCGCTC ACTGTGGAG GACGATGACA TGGGGACCT GTGGATGCT GAGGATATC
TTRACTCTGA ACCCGGTGG GTACAGGAAC CTGTCTGGA AGATGGCGAG TGACGACCTC CTCTACTGT ACCCCCTGGA CCACCTACGA CTCCTCATAG
991 N E D L G P A S P L D S T F Y R S L L E D D D M G D L V D A E E Y L

sau96I
haeIII/pali
asuI
sau96I
pspOMI/bsp120I
nlaIV
hgiJII
bsp1286
bmyI
banII
asuI
apaI
mnlI
4701 AATGAGGACT TGGGCCACG CAGTCCCTTG GACAGCACCT TCATCCGCTC ACTGTGGAG GACGATGACA TGGGGACCT GTGGATGCT GAGGATATC
TTRACTCTGA ACCCGGTGG GTACAGGAAC CTGTCTGGA AGATGGCGAG TGACGACCTC CTCTACTGT ACCCCCTGGA CCACCTACGA CTCCTCATAG
991 N E D L G P A S P L D S T F Y R S L L E D D D M G D L V D A E E Y L

scrFI
mvaI
ecorII
dsav
bstNI
bssKI
apyI
sexAI
sau96I
avaII
ppuMI
nlaIV
sfani
ecorI
bsmFI
mnlI
foki
bstF5I
bseRI
4701 AATGAGGACT TGGGCCACG CAGTCCCTTG GACAGCACCT TCATCCGCTC ACTGTGGAG GACGATGACA TGGGGACCT GTGGATGCT GAGGATATC
TTRACTCTGA ACCCGGTGG GTACAGGAAC CTGTCTGGA AGATGGCGAG TGACGACCTC CTCTACTGT ACCCCCTGGA CCACCTACGA CTCCTCATAG
991 N E D L G P A S P L D S T F Y R S L L E D D D M G D L V D A E E Y L

```

```

scrFI
ncII
mspI
hpaII
dsav
cauII
bssKI
bsII
xmaI/pspAI
smaI
scrFI
ncII
dsav
cauII
bssKI
bsaJI
mwOI
mwoI
bsII bsaJI hinPI
alwNI bslI avai hhaI/cfoI
mboII alw26I/bsmAI haeII
4801 TGGTACCCCA GCAGGGCTTC TTCTGTCCAG ACCCTGCCCC GGGCGTGGG GGCATGGTCC ACCACAGGCA CCGCAGCTCA TCTACCAGGA GTGGGGTGG
acc65I mboII
ACCATGGGCT CGTCCCGAAG AAGACAGGTC TGGGACGGGG CCGCGACCC CCGTACCAGG TGGTCTCCGT GGCCTCGAGT AGATGGTCTT CACCGCCACC
1025 V P Q Q G F F C P D P A P G A G G M V H H R H R S S S T R S G G G
bsII
rsaI
csp6I
nlaIV
kpnI
hgiCI
bani
asp718
acc65I
4901 GGACCTGACA CTAGGGCTGG AGCCCTCTGA AGAGGAGGCC CCGAGTCTC CACTGGCACC CTCCGAGGG GCTGGCTCCG ATGTAATTGA TGGTGACCTG
CCTGGACTGT GATCCCGACC TCGGGAGACT TCTCTCCGG GGGTCCAGAG GTGACCGTGG GAGGCTTCCC CGACCGAGCC TACATAAACC ACCACTGGAC
1058 D L T L G L E P S E E A P R S P L A P S E G A G S D V F D G D L
bsaJI
scrFI
mvaI
ecorII
dsav
bstNI
bssKI
bsII
bsaJI
tsp45I
maeIII
hphI apyI
bstEII
nlaIV
cac8I
nlaIV
bsII
bsaJI
nlaIV
hgiCI
bani mnII
bsrI bsII
tspRI bsII
4901 GGACCTGACA CTAGGGCTGG AGCCCTCTGA AGAGGAGGCC CCGAGTCTC CACTGGCACC CTCCGAGGG GCTGGCTCCG ATGTAATTGA TGGTGACCTG
CCTGGACTGT GATCCCGACC TCGGGAGACT TCTCTCCGG GGGTCCAGAG GTGACCGTGG GAGGCTTCCC CGACCGAGCC TACATAAACC ACCACTGGAC
1058 D L T L G L E P S E E A P R S P L A P S E G A G S D V F D G D L
bsmAI
xcml
scrFI
mvaI
ecorII
sau96I bsaI
nlaIV dsav
haeIII/palI
mnII asuI bstNI
bseRI bssKI
mboII eco0109I/draII
bani mnII
hgiCI
nlaIV
nlaIV
hgiCI
bsaJI
nlaIV
bsrI bsII
tspRI bsII
4901 GGACCTGACA CTAGGGCTGG AGCCCTCTGA AGAGGAGGCC CCGAGTCTC CACTGGCACC CTCCGAGGG GCTGGCTCCG ATGTAATTGA TGGTGACCTG
CCTGGACTGT GATCCCGACC TCGGGAGACT TCTCTCCGG GGGTCCAGAG GTGACCGTGG GAGGCTTCCC CGACCGAGCC TACATAAACC ACCACTGGAC
1058 D L T L G L E P S E E A P R S P L A P S E G A G S D V F D G D L

```







```

rmaI
maeI
styI
bsaJI
blnI
avzII
haeIII/pa
stuI
haeI
mnlI bfaI
mnlI bseRI
TTTTGGAGGCC
5501 CAGAAGGCCA AGTCCCGAGA AGCCCTGATG TGTCTCAGG GAGCAGGGAA GCGGGCTCT GAGCTATCC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC
GTCTTCCGGT TCAGGCGTCT TCGGACTAC ACAGGACTCC CTCGCCCTT CCGCCGGAGA CTCGATAAGG TCTTCATCAC TCCTCCGAAA AAACCTCCGG

mnlI aluI
haeIII/pali
fnu4HI/bsoFI
aciI ddeI
5501 CAGAAGGCCA AGTCCCGAGA AGCCCTGATG TGTCTCAGG GAGCAGGGAA GCGGGCTCT GAGCTATCC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC
GTCTTCCGGT TCAGGCGTCT TCGGACTAC ACAGGACTCC CTCGCCCTT CCGCCGGAGA CTCGATAAGG TCTTCATCAC TCCTCCGAAA AAACCTCCGG

mnlI
eco8II mwoI
bsu36I/mstII/sauI
ddeeI
5501 CAGAAGGCCA AGTCCCGAGA AGCCCTGATG TGTCTCAGG GAGCAGGGAA GCGGGCTCT GAGCTATCC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC
GTCTTCCGGT TCAGGCGTCT TCGGACTAC ACAGGACTCC CTCGCCCTT CCGCCGGAGA CTCGATAAGG TCTTCATCAC TCCTCCGAAA AAACCTCCGG

mwoI
haeIII/pali
haeI
aciI
5501 CAGAAGGCCA AGTCCCGAGA AGCCCTGATG TGTCTCAGG GAGCAGGGAA GCGGGCTCT GAGCTATCC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC
GTCTTCCGGT TCAGGCGTCT TCGGACTAC ACAGGACTCC CTCGCCCTT CCGCCGGAGA CTCGATAAGG TCTTCATCAC TCCTCCGAAA AAACCTCCGG

mnlI
haeIII/pali
fnu4HI/bsoFI
aciI ddeI
5501 CAGAAGGCCA AGTCCCGAGA AGCCCTGATG TGTCTCAGG GAGCAGGGAA GCGGGCTCT GAGCTATCC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC
GTCTTCCGGT TCAGGCGTCT TCGGACTAC ACAGGACTCC CTCGCCCTT CCGCCGGAGA CTCGATAAGG TCTTCATCAC TCCTCCGAAA AAACCTCCGG

mnlI
haeIII/pali
fnuDII/mvni
sacII/sstII
mspAII/nspBII
kspi bsp1286
dsai bmyI
bsaJI asuI
fnu4HI/bsoFI
haeIII/pali
mcrI banII
eagI/xmaII/eclXI
eaeI cac8I
cfrI acil
bsiEi asuI
notI bstUI
fnu4HI/bsoFI
aciI bsh1236I
scaI xbaI bsrBI aciI apaI
mnlI drdI maeII
CAAGTCTAT GACCTCCTAA
5601 TAGGCTTTTG CAAAAGCTT ATCGATACCG TCGACTCGAG AGTACTTCTA GAGCGCGCG GGGCCCATCG CCTCTGACAG CAAGTCTAT GACCTCCTAA
ATCCGAAAAC GTTTTTCGAA TAGCTATGCC AGCTGAGCTC TCATGAAGAT CTCGCCCGGG CCCGGGTAGC GGAGACTGTC GTTCGAGATA CTGGAGGATT
^inicio del inserto de BS de HER2 xba-hindIII
^inicio de hgh ex 4 (cla/nar)
^TG PCR 5' p

xhoI
smlI
pleI
taqi taqi
sali paeR7I
clai/bsp106 hinfi
alul bspDI
hindIII taqi
5601 TAGGCTTTTG CAAAAGCTT ATCGATACCG TCGACTCGAG AGTACTTCTA GAGCGCGCG GGGCCCATCG CCTCTGACAG CAAGTCTAT GACCTCCTAA
ATCCGAAAAC GTTTTTCGAA TAGCTATGCC AGCTGAGCTC TCATGAAGAT CTCGCCCGGG CCCGGGTAGC GGAGACTGTC GTTCGAGATA CTGGAGGATT
^final del inserto de HER2 humano desde BS en xhoI

```

rmaI  
 maeI  
 bfaI  
 sau96I  
 avaII  
 asuI  
 ppuMI mnlI foki  
 eco0109I/draII sfaNI bstF5I  
 AAGACCTAGA GGAAGGCATC CAAACGGCTG AAGATGGCT TGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT  
 TCGGTGATCT CATTCCGTAG GTTTGGGACT ACCCTCCGA CCTTCTACCG TCGGGGGCCT GACCCCGTCTA GAAGTTCGTC TGGATGTCGT TCAAGCTGTG  
 5701 AAGACCTAGA GGAAGGCATC CAAACGGCTG AAGATGGCT TGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT  
 ^ fin de ex 4 / inicio ex 5

mspl  
 hpaII  
 scrFI  
 nciI  
 dsav  
 cauII  
 bssKI  
 bslI  
 tsei bsII  
 fnu4HI/bsOFI  
 mnlI mboII bbvI bsaJI bsyI bglII scfI taqI  
 nmlI mnlI GGAAGATGC AGCCCGCGA CTGGGCAGAT CTTCAAGCAG ACCTACAGCA AGTTGCACAC  
 TCGGTGATCT CATTCCGTAG GTTTGGGACT ACCCTCCGA CCTTCTACCG TCGGGGGCCT GACCCCGTCTA GAAGTTCGTC TGGATGTCGT TCAAGCTGTG  
 5801 AAGACCTAGA GGAAGGCATC CAAACGGCTG AAGATGGCT TGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT  
 TTGAGTGAGTGT GTGATGAGTGT CTTGATGCCC GACGAGATGA CGAAGTCCTT CCTGTACCCTG TTCCAGCTCT GTAAGGACCC GTAGCAGGTC

kmaI  
 maeI  
 bfaI  
 sau96I  
 avaII  
 asuI  
 ppuMI mnlI foki  
 eco0109I/draII sfaNI bstF5I  
 AAGACCTAGA GGAAGGCATC CAAACGGCTG AAGATGGCT TGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT  
 TCGGTGATCT CATTCCGTAG GTTTGGGACT ACCCTCCGA CCTTCTACCG TCGGGGGCCT GACCCCGTCTA GAAGTTCGTC TGGATGTCGT TCAAGCTGTG  
 5701 AAGACCTAGA GGAAGGCATC CAAACGGCTG AAGATGGCT TGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT  
 ^ fin de ex 4 / inicio ex 5

mspl  
 hpaII  
 scrFI  
 nciI  
 dsav  
 cauII  
 bssKI  
 bslI  
 tsei bsII  
 fnu4HI/bsOFI  
 mnlI mboII bbvI bsaJI bsyI bglII scfI taqI  
 nmlI mnlI GGAAGATGC AGCCCGCGA CTGGGCAGAT CTTCAAGCAG ACCTACAGCA AGTTGCACAC  
 TCGGTGATCT CATTCCGTAG GTTTGGGACT ACCCTCCGA CCTTCTACCG TCGGGGGCCT GACCCCGTCTA GAAGTTCGTC TGGATGTCGT TCAAGCTGTG  
 5801 AAGACCTAGA GGAAGGCATC CAAACGGCTG AAGATGGCT TGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT GGGGGAGGCT  
 TTGAGTGAGTGT GTGATGAGTGT CTTGATGCCC GACGAGATGA CGAAGTCCTT CCTGTACCCTG TTCCAGCTCT GTAAGGACCC GTAGCAGGTC

```

scrFI
ncil
mspI
hpaII
dsaV
xmaI/pspAI
smaI
scrFI
ncil
dsaV
cauII
bssKI
tseI cauII
fnu4HI/bsoFI
bbvI bssKI
alul
pvuII
tseI
mwoI
fnu4HI/bsoFI
mwoI
acII
fnu4HI/bsoFI
bbvI
mnlI mspAII/nspBII
alul aval
bfaI bglI
fnu4HI/bsoFI
bbvI
5901 TGGCCCTCTG TGGAGGCAG CTGTGGCTTC TAGCTGCCCG GGTGGCATCC CTGTGACCCC TCCCAGTGC CTCTCCTGGC CTTGGAAAGTT GCCACTCCAG
ACGGCGAGAC ACCTCCCGTC GACACCGAAG ATCGACGGGC CCACCGTAGG GACACTGGG AGGGTCCAG GACAGGACCG GGACCTCAA CGGTGAGGTC
^ fin de spe-sma pBK-CMV/inserto de hgh para reemplazar el intrón
^ cebador TG PCR 3'

xmaI
maeI
bfaI
trusI
mseI
tsp509I
sfaNI
ahdI/eam1105I
sspI
mnlI
6001 TGCCACCAG CCTTGTCCTA ATAAATTA GTTCATCAT TTGTCTGAC TAGGTGCTCT TCTATAATAT TATGGGGTGG AGGGGGTGG TATGGAGCAA
ACGGGTGGTC GGAACAGGAT TATTTTAATT CAACGTAGTA AAACAGACTG ATCCACAGGA AGATATTATA ATACCCACC TCCCCCACC ATACCTCGTT
^ fin de hgh exón5

```





```

scriFI
mvaI
ecofII
dsv nlaIV
bstNI
bssKI
bsaJI
apyI hgici
mspI
hpaII
mwoI bani
nlaIII aluI
tsp509I aciI
tsp509I
6601 CATGGTCATA GCTGTTTCCT GTGTGAATT GTTATCCGCT CACAAITCCA CACAACATAC GAGCCGGAAG CATAAAGTGT AAAGCCTGGG GTGCCTAATG
GTACCAGTAT CGACAAGGA CACACITTA CAAATAGCGA GCTTAAAGT GTGTTGTATG CTCGGCCCTC GTATTTTACA TTTCGGACCC CACGGATTAC
bsrBI
tsp509I aciI
tsp509I
6701 ACTGAGGTAA CTCACATTA TTGCGTTGCG CTCACTGCC GCTTCCAGT CGGAAACCT GTCGTCCAG CTGGATTAAT GAATCGGCCA ACGCCGGGG
TCACTCCATT GAGTGAATT AACGCAAGC GAGTGACGG CGAAGGTCA GCCCTTTGGA CAGCACGGTC GACCTAATTA CTTAGCCGCT TCGCCGGCCC
acuI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
hhaI/cfoI
eaeI
thai
fnuDII/mvni
aluI tru9I
pvuII mseI tfiI haeIII/palI
mspAII/nspBII hinfi bsII bstUI
cac8I aseI/asnI/vspI bsh1236I
6801 AGAGGGGTT TCGGTATTGG CGGCTCTTCC GCTTCCCTCC TCACTGACTC GTGCGCTCG GTCGTTCCG TCGCGGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG
TCTCCGCCAA ACGCATAACC CGCAGAAAG CGAAGGAGC AGTACTGAG CCACGGAGC CAGCAAGCCG ACGCCGCTCG CCATAGTCCA GTGAGTTTCC
mwoI
earI/ksp632I
hinPI
sapi
hinPI aciI
hhaI/cfoI
pleI tseI mcrI
hinfi fnu4HI/bsoFI
bbvI bsvBI
mnlI mwoI haeII mboII mnlI tspRI bsvEI
bbvI cac8I
aluI
acuI
6801 AGAGGGGTT TCGGTATTGG CGGCTCTTCC GCTTCCCTCC TCACTGACTC GTGCGCTCG GTCGTTCCG TCGCGGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG
TCTCCGCCAA ACGCATAACC CGCAGAAAG CGAAGGAGC AGTACTGAG CCACGGAGC CAGCAAGCCG ACGCCGCTCG CCATAGTCCA GTGAGTTTCC

```

scrFI mwoI  
 mvaI thaI  
 ecorII fnuDII/mvni  
 dsav bstUI  
 bstNI bsh1236I  
 bssKI acII cac8I  
 nlaIII bsII nlaIV bsoFI  
 nspHI cac8I apyI bsII fnu4HI/bsoFI  
 nspI haeIII/palI haeIII/palI haeIII/palI  
 aflIII haeI haeI nlaIV haeIII/palI  
 tfII haeI haeI nlaIV haeIII/palI  
 hinFI haeI haeI nlaIV haeIII/palI  
 6901 CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGGAGG AAAGAATG TGACGAAAG GCCACGAAA CGTAAAAGG CCGGTTGCT  
 GCCATTATGC CAATAGGCT CTAGTCCC CTATGCTCC TTCTTGTAC ACTCGTTTC CCGTCGTTTT CCGGTCCTTG GCATTTTTCC GCGCAACGA

scrFI  
 mvaI  
 ecorII  
 dsav  
 bstNI  
 bssKI  
 apyI  
 hgaI  
 drdI  
 taqI smlI mnlI  
 nlaIV nlaIV sfaNI  
 7001 GCGTTTTTC CATAGCTCC GCCCCCCTGA CGACATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGGA AACCCGACAG GACTATAAG ATACCAGGCG  
 CCGCAAAAAG GTATCCGAGG CCGGGGACT GCTCGTAGTG TTTTGTAGCTG CCGAGTTCAGT CTCCACCGCT TTGGGCTGTC CTGATATTTT TATGTTCCCG

scrFI  
 mvaI  
 ecorII  
 dsav  
 bstNI  
 bssKI  
 apyI  
 bsaJI  
 aluI  
 7101 TTTCCCCTG GAAGTCCCT CGTGGCTCT CCGTGTCCGA CCTTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCT TTCTCCCTTC GGGAAAGCTG GCGTTTCTC  
 AAAGGGGAC CTTGAGGGA GCACCCGAGA GGACAAGGT GGGACGGCA ATGGCTATG GACAGGGCGA AAGAGGGAAG CCTTCCGCAC CCGGAAAGAG

hgiAI/aspHI  
 bsp1286  
 bsiHKAI  
 bmyI  
 apaLI/snoI  
 alw4I/snoI  
 aluI  
 ddeI  
 scfI  
 7201 AATGCTACG CTGTAGGAT CTCAGTTGG TGTAGGCTG TCGTCCAG CTGGCTGTG TGCACGAAAC CCGCTTCCAG CCGGACCGCT GCGCTTATC  
 TTACGAGTGC GACATCCATA GAGTCAAGCC ACATCCAGCA AGCGAGTTC GACCCGACAC ACGTCTTG GGGGCAAGTC GGGCTGGCA CCGGAATAG



```

mspi      alwNI
hpaiI     alw26I/bsmAI
scrFI     tseI
nciI      fnu4HI/bscFI
          bbvI
          tseI      bsrI
          bsrI     fnu4HI/bscFI     maeIII
          tspRI    bbvI      tspRI      mnlI      aciI
          smlI     maeIII
7301 CGGTAACAT CGTCTTGACT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATGCCAC CACTGGTAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT
GCCATTGATA GCAGACTCA GGTGGGCCA TTCTGTGCTG AATAGGGTG ACCGTCTGTCG GTGACCAATG TCCTAATCGT CTCGCTCCAT ACATCCGCCA

          bslI      rmaI
          haeIII/palI     maeI      hinPI     eco57I     maeIII
          haeI      bfaI      hhaI/cfoI      bsrI
scfI      7401 GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TAGCGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGGCCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG
CGATGTCTCA AGAAGCTCAC CACCGGATTG ATGCCGATGT GATCTTCCCTG TCATAAACCA TAGAGCGGAG ACGACTTCGG TCAATGGAAG CCTTTTCTC

          mspl     sau3AI
          hpaiI     sau3AI      hinPI
          sau3AI     sau3AI      mboI/ndeII     dpnII
          mboI/ndeII     mboI/ndeII     dpnII
          dpnII      dpnII      tseI      fnuDII/mvni
          dpnI      alwI      fnu4HI/bscFI     hhaI/cfoI
          alwI      alwI      bbvI      bstUI      bstYI/xhoII     bstYI/>
          aluI      alwI      cac8I     mwOI      bsh1236I      alwI     smlI     mboII
          alwI      alwI      msplI/nspBII     aciI     aciI
7501 TTGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTGTTTTGCA AGCAGCAGAT TAGCGCGAGA AAAAAAGGAT CTCAGAAGA
AACCATCGAG AACTAGGCCG TTTGTTTGGT GCGACCAIC GCCACCAAAA AACCAACGT TCGTCTCTA ATGCGCGCTCT TTTTTTCTA GAGTCTTCT

          sau3AI
          mboI/ndeII     sau3AI      mboII
          dpnII      sau3AI      dpnII
          dpnI      dpnI      tru9I      nlaIII
          sau3AI     mboI/ndeII     msel     rcal
          dpnII      dpnI      taiI      bspHI
          dpnI      hgaI     tspRI     maeII
          sau3AI     mboI/ndeII     ddeI      hgaI     tspRI
7601 TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACC TCAGTGGAAC GAAACTCAC GTTAAGGAT TTTGGTCATG AGATATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC
AGGAAACTAG AAAAGATGCC CCAGACTGG AGTCACCTTG CTTTGGAGTG CAATCCCTA AAACCACTAC TCTAATAGT TTTTCTAGAA GTGGATCTAG

```

```

tru9I          nlaIV          nlaIV
tsp509I        hgiCI          hgiCI
tru9I          mnlI          mnlI
mseI mseI     tspRI bani    ddeI
ahaIII/draI   maeIII          maeIII
7701 CTTTTRAAAT AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG
GAAAATTTAA TTTTACTTC AAAATTTAGT TAGATTTCT ATATACTCAT TTGAACCAGA CTGTCAATGS TTACGAATTA GTCACCTCCGT GGATAGAGTC

sau3AI        pleI          pleI
mboI/ndeII   hinfI        hinfI
dpmII        ahdI/eam1105I
dpmI         bstF5I      bstF5I
7801 CGATCTGTCT ATTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCC CCTCGTAG ATAATACTACA TACGGGAGGG CTTACCATCT GCCCCAGTG CTGCAATGAT
GCTAGACAGA TAAAGCAAGT AGGTATCAAC GGACTGAGGG GCAGCACATC TATTGATGCT ATGCCCTCCC CCGGGGTACA CCGGGGTACA GACGTTACTA

bsmAI
bsaI
thaI
fnuDII/mvni  mspI bpmI/gsui  mspI
bstUI        hpaII       hpaII
bsh1236I    cfr10I/bsrPI
aciI        hphI nlaIV     hphI
7901 ACCCGGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCGGAAAG GCGCGAGCGG AGAAGTGCTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC
TGGGGCTCTG GGTGGAGTG GCCGAGGTCT AAATAGTCTT TATTTGGTGG TCTTACCAGG GACGTTGAAA TAGGGGAGG

scrFI
ncII
mspI
hpaII
tsp509I     dsav xmaI
tru9I       cauiI maeI
mseI        bssKI bfaI
bsrI        aseI/asnI/vspI aluI
8001 ATCCAGTCTA TTAATTTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG TTGCCATTGC TCGTGGCATC GTGGTGTAC
TAGGTCAGAT AATTAACAAC GGCCTTTCGA TCTCATTCAT CAACGGTCA ATTATCAAC GCGTTGCAAC AACGGTAAAG ACACCCGTAG CACCACAGTG

```

sau3AI  
mboI/ndeII  
dpnII  
dpnI  
nlaIII  
nlaIII  
maeIII alwI nlaIII  
aciI aluI  
sau96I  
avaII  
asuI  
8101 GCTCGTGT TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGTTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTCCG  
CGAGCAGCAA ACCATACCGA AGTAAGTCGA GGCCAAGGCT TGCTAGTTCC GCTCAATGTA CTAGGGGTA CAACAGGTTT TTTGGCCAAT CGAGGAAGCC  
sau3AI  
mboI/ndeII  
dpnII  
dpnI  
nlaIII  
nlaIII  
maeIII alwI nlaIII  
aciI aluI  
sau96I  
avaII  
asuI  
8201 TCCTCCGATC GTTGCAGAA GTAAGTGGC GCAGTGITA TCACATGAGG TTAGGCGAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC  
AGGAGGCTAG CAACAGTCTT CATTCAACCG CGTCAACAAT AGTGAGTACC AATACCCTGC TGACGTATTA AGAATATGAC AGTACGGTAG CCATTCATCG  
sau3AI  
mboI/ndeII  
dpnII  
dpnI  
nlaIII  
nlaIII  
maeIII alwI nlaIII  
aciI aluI  
sau96I  
avaII  
asuI  
8301 TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCAGG AATAGTGTAT CGCGGACCG AGTTGCTCTT GCCCGGGCTC ATCAGGGAT AATACCGCGC  
AAAAGACACT GACCACTCAT GAGTTGGTTC AGTAGACTC TTATCACATA CGCGGCTGC TCAACGAGAA CGGCGCGCAG TAGTGCCCTA TTATGGCGCG  
sau3AI  
mboI/ndeII  
dpnII  
dpnI  
nlaIII  
nlaIII  
maeIII alwI nlaIII  
aciI aluI  
sau96I  
avaII  
asuI  
8401 CACATAGCAG AACTTTAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGG CGAAAATCTT CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CCATGTAACC  
GTGTATCGTC TTGAATTTT CACGAGTAGT AACCTTTTC AAGAAGCCCC GCITTTGAGA GTTCTAGAA TGCGGACAC TCTAGGTCAA GCTACATTGG

```

hgiAI/aspHI
bsp1286          eco57I
bsiHKAI         mboII
bmyI           sau3AI
apaLI/snoI     mboI/ndeII
alw44I/snoI   dpnII
bssSI         dpnI          sfaNI          hphI
8501 CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTGACGATC TTTTACTTTC ACCAGCGTT CTGGGTGAGC AAAAAAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAA GGAATTAAGG
GTGAGCACGT GGGTTGACTA GAAGTCGTAG AAATGAAAG TGGTCCAAA GACCCACTCG TTTTGTCTCT TCCGTTTTAC GCGGTTTTTT CCCTTATCC
          aciI
          fnu4HI/bsofI
          nlaIII
          rcaI          bciVI
          bspHI aciI
          bsmAI bsrBI
msI
8601 GCGACAGGA AATGTTGAAT ACTCATCTC TTCCTTTTTT AATATATTG AAGCATTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAAATGTA
CGCTGTGCTT TTACAACTTA TGAGTATGAG AAGGAAAAG TTATAATAAC TTCGTAATA GTCCCAATAA CAGAGTACTC GCGTATGTAT AAACCTTACAT
          hinPI
          thai
          fnuDII/mvni
          bstUI
          bsh1236I
          aciI
          nlaIV hhaI/cfoI
8701 TTTAGAAAAA TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA
AAATCTTTTT ATTGTTAT CCCCAAGCGG CGTGTAAAGG GCGTTTTAC GGTGACTGC AGATTCTTTG GTAATAATAG TACTGTAAAT GGATATTTTT
          hinPI
          thai
          fnuDII/mvni
          bstUI
          bsh1236I
          hinPI
          thai
          fnuDII/mvni
          bstUI
          bsh1236I
          mnlI hhaI/cfoI hphI mnlI
          bssSI asuI bbsI
8801 TAGGGTATC ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATACTGC CTGCGGGTTC TCGGTGATCA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
ATCCGCATAG TGCTCCGGA AAGCAGAAGT TCTTATGACG GAGCGGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACGTCGAGGG CCTCTGCCAG
          msPI
          scrFI
          nciI espJI
          dsav bsmBI
          tsel cauiI
          fnu4HI/bsofI
          nlaIII bssKI
          nspHI aluI hpaII
          nspI bbVI bsII bsmAI maeIII
          tsp45I

```

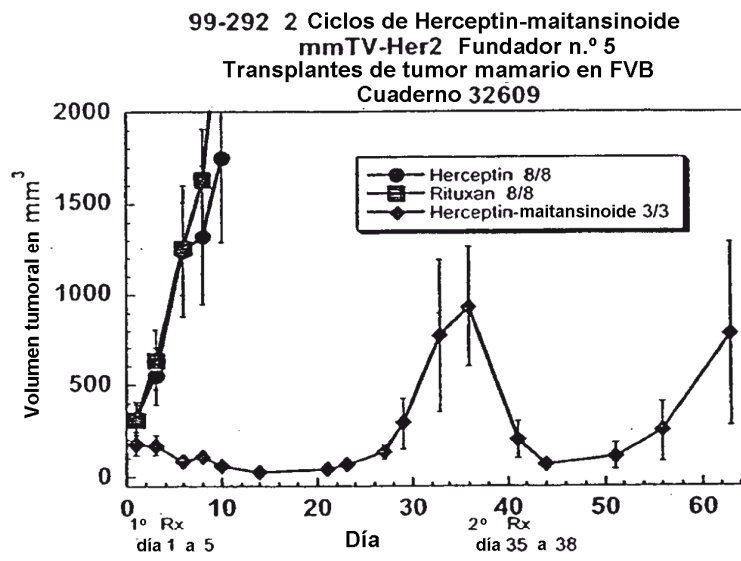
```
      sciFI  
      ncii  
      msPI  
      hpaiI  
      dsAV  
      sfaNI  
      fokI cauII  
      bstF5I  
      aciI  bssKI  drdI  
      aluI  
8901 ACAGCTTGTC TGTAAAGCGA TGCCGGGAGC AGACAAGCCC GTCAGGGCGT GTCAGGGGGT GTCAGGGGGT GTCGGGGGGC AGCCATGACC CAGTCACGTA  
      TGTGGAACAG ACATTGCGCT ACGGCCCTCG TCIGTTCGGG CAGTCCCGG CAGTCGCCCA CAACGCCCA CAGCCCCCGG TCGSTACTGG GTCAGTGTCAT  
      hgaI  
      thaI  
      fnuDII/mvni  
      bstUI aciI  
      bsh1236I  
      hinPI mspAII/nbspBII  
      hhaI/cfoI  
      tsei  
      fnu4HI/bsoFI  
      bsvI  
      hinPI nlaIII  
      hhaI/cfoI pflpI maeIII  
      bsri  
      tchl111/aspI  
      tsp45I  
      taeI  
      maeII  
      bsAI  
      mwoI  
      bstAPI  
      hgiAI/asphi  
      bsp1286  
      bsiHKAI  
      bmyI ndeI  
      apaLI/snoI  
      alw4I/snoI aciI  
      gAGTGCACCA  
      GAGTGCACCA  
      TATGGCGTGT  
      GAAATACCGC  
      ACAGATGCGT  
      AAGGAGRAAA  
9001 GCGATAGCGG AGTTGGCTTA ACTATGGGCG ATCAGAGCAG ATTGTACTGA GAGTGCACCA TATGGCGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT GAAATACCGC AAGGAGRAAA  
      CGCTATCGCC TCAACCGAAT TGATACGCCG TAGTCTCGTC TACATGACT CTCACGTGCT ATACGCCCA CTTTATGGCG TGCTACGCA TTCCTCTTTT  
      mwoI  
      hinPI  
      hhaI/cfoI  
      nlaIV  
      nari  
      kasi  
      hinII/acyI  
      hgiCI  
      heeII  
      ebei  
      bani  
      ahaII/bsaHI  
      sfaNI ebei  
      mwoI bglI  
      aciI  
7101 TACCGCATCA GCGGCAATC GCCATTCAGG CACAGCAACT GTTGGGAAGG CCGATCGGTG CCGGCCCTCTT CGCTATTAGG CCAGCTGGCG AAGGGGGAT  
      ATGCCGTAAG CCGGTAAGCGG CCGTAACTCC CAAACCTTCC GATCGTTGA CATCGGTTGA CCGCGGAGAA GCGATAATGC GGTGACCGC TTCGCCCTTA  
      sau3AI  
      mboI/ndeII  
      dpnII  
      dpnI  
      haeIII/palI  
      pvul/bspCI sau96I  
      mcrI  
      bsiEI  
      mwoI  
      cac8I  
      earI/ksp63ZI  
      earI/ksp63ZI  
      mspAII/nbspBII  
      pvuII  
      cac8I  
      foki  
      bstF5I
```

```

scrFI
mvaI
ecorII
dsaV
bstNI
bskKI
bsaJI
apyI
tseI
fnu4HI/bsaFI
bbvI
tru9I
mseI
maeIII
maeIII
maeIII
bsrI
maeIII
tail
tsp45I
maeIII
bsrI
maeIII
tspRI
bsrI
haeIII/paiI
eaeI
cfrI
9201 GTGCTGCAAG GCGATTAAAGT TGGGTAACGC CAGGGTTTTC CCAGTCACGA CGTTGTAAAA CGACGGCCAG TGCC
CACGACGTTT CGCTAATTCA ACCCAATTGG GTCCCAAAG GGTCAAGTGT GCAACATTTT GCTGCCGGTC ACGG

```

Figura 5



**Dominio variable pesado**

		10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGT	SVKISCKAS	[GFTFTD	YTM]	WVKQS
	** ** *	* ** *			**
574	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLS	CAAS	[GFTFTD	YTM]
				** * *	
hum III	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLS	CAAS	[GFTFSS	YAMS]
					WVRQA
		50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG	[DVNPNS	GGSIYN	QRFKG]	KASLT
	* * **				** * ** * *
574	PGKLEWVA	[DVNPNS	GGSIYN	QRFKG]	RFTLS
					VDRSKNTLYL
					* * *
hum III	PGKLEWVA	[VISGDG	GGSTYY	ADSVKG]	RFTISR
					DNSKNTLYL
	abc	90	100ab	110	
2C4	ELRSLTFEDTAVYY	CAR	[NLGPS	FYFDY]	WGQGT
	** * **				**
574	QMNSLRAEDTAVYY	CAR	[NLGPS	FYFDY]	WGQGT
					LVTVSS
					** * * * * *
hum III	QMNSLRAEDTAVYY	CAR	[GRVGYS	LYDY]	WGQGT
					LVTVSS

**Figura 6**



**Dominio variable ligero**

		10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIM	STSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQR	P
	**	**** *	*		*
574	DIQMTQSPSSLSAS	VGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQK	P
			* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPSSLSAS	VGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQK	P
		50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY	[SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	**		* *	*	**
574	GKAPKLLIY	[SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
		* *****			
hum κI	GKAPKLLIY	[AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
		90	100		
2C4	EDLAVYYC	[QYYIYPYT]	FGGGTKLEIKRT		
	* *		* *		
574	EDFATYYC	[QYYIYPYT]	FGQGTKVEIKRT		
		*** *			
hum κI	EDFATYYC	[QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKRT		

**Figura 7**