

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 226**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10798541 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2516469**

54 Título: **Anticuerpos anti-HER3 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

22.12.2009 EP 09015831

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

24.05.2016

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)
Wagistrasse 18
8952 Schlieren-Zuerich, CH**

72 Inventor/es:

**BOSENMAIER, BIRGIT;
DIMOUDIS, NIKOLAOS;
FRIESS, THOMAS;
GEORGES, GUY;
KOLM, IRENE;
KRELL, HANS-WILLI;
LIFKE, VALERIA y
MOESSNER, EKKEHARD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 571 226 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-HER3 y usos de los mismos

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos ligantes de HER3 humano (anticuerpo anti-HER3), a métodos para su producción, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos, y a usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

- 10 La HER3 humana (ErbB-3, ERBB3, c-erbB-3, c-erbB3, receptor de tirosina-proteína quinasa erbB-3, SEC ID nº 17) codifica un elemento de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE) de receptor tirosina quinasa que incluye además HER1 (también conocido como RFCE), HER2 y HER4 (Kraus M.H. *et al.*, PNAS 86:9193-9197, 1989; Plowman G.D. *et al.* 87:4905-4909, 1990; Kraus M.H. *et al.*, PNAS 90:2900-2904, 1993).
 15 Al igual que el receptor del factor de crecimiento epidérmico prototípico, el receptor transmembrana HER3 consiste de un dominio extracelular de unión a ligando (DEC), un dominio de dimerización dentro de DEC, un dominio transmembrana, un dominio intracelular de proteína tirosina quinasa (DTQ) y un dominio C-terminal de fosforilación. Esta proteína unida a membrana presenta HER3 un dominio de unión a heregulina (HRG) en el dominio extracelular pero no un dominio de quinasa activo. Por lo tanto, puede unirse a dicho ligando pero no transmitir la señal al interior de la célula mediante fosforilación de proteínas. Sin embargo, forma heterodímeros con otros elementos de la familia
 20 de HER que sí presentan actividad de quinasa. La heterodimerización conduce a la activación de la ruta de señalización mediada por receptores y la trans-fosforilación de su dominio intracelular. La formación de dímero entre elementos de la familia de HER expande el potencial de señalización de HER3 y es un medio no sólo para la diversificación de la señal sino también para la amplificación de señales. Por ejemplo, el heterodímero HER2/HER3 induce una de las señales mitogénicas más importantes a través de la ruta PI3K y AKT entre los miembros de la
 25 familia de HER (Sliwkowski M.X., *et al.*, J. Biol. Chem. 269:14661-14665, 1994; Alimandi M *et al.*, Oncogene 10:1813-1821, 1995; Hellyer N.J., J. Biol. Chem. 276:42153-4261, 2001; Singer E., J. Biol. Chem. 276:44266-44274, 2001; Schaefer K.L., Neoplasia 8:613-622, 2006).

- 30 La amplificación de dicho gen y/o la sobreexpresión de su proteína se han informado en numerosos cánceres, incluyendo los tumores de próstata, vejiga y mama. Se han caracterizado variantes alternativas de procesamiento transcripcional codificantes de diferentes isoformas. Una isoforma no presenta región intermembrana y se secreta al exterior de la célula. Esta forma actúa modulando la actividad de la forma unida a membrana. También se ha informado de variantes de procesamiento adicionales, aunque no se han caracterizado por completo.

- 35 El documento nº WO 97/35885 se refiere a anticuerpos de HER3. El documento nº WO 2003/013602 se refiere a inhibidores de la actividad de HER, incluyendo anticuerpos de HER. Los documentos nº WO 2007/077028 y nº WO 2008/100624 se refieren además a anticuerpos de HER3.

Descripción resumida de la invención

- 40 La invención comprende un anticuerpo que se une a HER3 humano, caracterizado porque el dominio variable de cadena pesada V_H es la SEC ID nº 8, y el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID nº 9, o el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID nº 10, o el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID nº 11.

- 45 La invención comprende además un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada V_H de SEC ID nº 8, y un dominio variable de cadena ligera V_L de SEC ID nº 9 o SEC ID nº 11.

- 50 La invención comprende además un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada V_H de SEC ID nº 8, y un dominio variable de cadena ligera V_L de SEC ID nº 10.

- 55 Se describe además un anticuerpo que se une a HER3 humano, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada V_H que presenta una identidad de secuencias de por lo menos 95% respecto a SEC ID nº 8 y un dominio variable de cadena ligera V_L que presenta una identidad de secuencias de por lo menos 95% respecto a SEC ID nº 9, SEC ID nº 10 o SEC ID nº 11.

- En una realización, el anticuerpo según la invención se caracteriza porque el anticuerpo es monoclonal.

En una realización, el anticuerpo según la invención se caracteriza porque el anticuerpo es de subclase IgG1 o IgG4.

- 60 La invención comprende además una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un anticuerpo según la invención.

La invención comprende además un anticuerpo según la invención para el tratamiento del cáncer.

La invención comprende además la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

5 Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico codificante de una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo anti-HER3 proporcionado en la presente memoria.

10 La invención comprende además un ácido nucleico codificante de una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo ligante de HER3 humano, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende un dominio variable V_H de SEC ID n° 8 y un dominio variable de cadena ligera V_L de SEC ID n° 9, SEC ID n° 10 o SEC ID n° 11.

La invención comprende además un vector de expresión caracterizado porque comprende un ácido nucleico según la invención para la expresión del anticuerpo según la invención en una célula huésped procariótica o eucariótica.

15 La invención comprende además una célula huésped procariótica o eucariótica que comprende un vector según la invención.

20 La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo recombinante según la invención, caracterizado porque se expresa un ácido nucleico según la invención en una célula huésped procariótica o eucariótica y recuperar dicho anticuerpo a partir de dicha célula o del sobrenadante del cultivo celular.

25 Inesperadamente se ha encontrado que los anticuerpos según la invención presentan propiedades altamente valiosas, tales como una fuerte inhibición del crecimiento de las células de cáncer expresantes de HER3, una fuerte inhibición de la transducción de señales mediada por HER3 (tal como, por ejemplo, la fosforilación de HER3 y la fosforilación de AKT), que se relaciona con la proliferación de las células de cáncer, una afinidad de unión elevada a HER3 o excelentes propiedades farmacocinéticas (tales como una vida media prolongada, etc.).

Descripción detallada de la invención

30 La invención comprende un anticuerpo que se une a HER3 humano, caracterizado porque el dominio variable de cadena pesada V_H es la SEC ID n° 8, y el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID n° 9, o el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID n° 10, o el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID n° 11.

35 La invención comprende además un anticuerpo según la invención caracterizado porque el dominio variable de cadena pesada V_H es la SEC ID n° 8, y el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID n° 9, o el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID n° 10, o el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID n° 11.

40 En una realización, el anticuerpo según la invención se caracteriza porque el dominio variable de cadena pesada V_H es la SEC ID n° 8, y el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID n° 9, o el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID n° 11.

En una realización, el anticuerpo según la invención se caracteriza porque el dominio variable de cadena pesada V_H es la SEC ID n° 8, y el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID n° 10.

45 En una realización, el anticuerpo según la invención es monoclonal. En una realización, el anticuerpo según la invención es humanizado o humano. En una realización, el anticuerpo según la invención es de la subclase IgG1 o IgG4. En una realización, el anticuerpo según la invención es un anticuerpo humanizado monoclonal de la subclase IgG1. En una realización, el anticuerpo según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo se encuentra glucosilado con una cadena sacárida en Asn297, en la que la proporción de fucosa en dicha cadena sacárida es 65% o inferior.

50 La invención comprende los anticuerpos humanizados mAb 205.10.1, mAb 205.10.2 y mAb 205.10.3 con sus V_H y V_L respectivas.

Anticuerpo	VH	VL
mAb 205.10.1	SEC ID n° 8	SEC ID n° 9
mAb 205.10.2	SEC ID n° 8	SEC ID n° 10
mAb 205.10.3	SEC ID n° 8	SEC ID n° 11

55 En una realización, dichos anticuerpos comprenden regiones constantes de origen humano, por ejemplo SEC ID n° 12 a 16, preferentemente de SEC ID n° 12 a 13.

60 El término "anticuerpo" comprende las diversas formas de estructura de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpo. El anticuerpo según la invención preferentemente es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, o también un anticuerpo genéticamente manipulado, con la condición de que se conserven las propiedades características según la invención.

La expresión "fragmentos de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo de longitud completa, preferentemente el dominio variable del mismo, o por lo menos el sitio de unión de antígeno del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen diacuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multispecíficos formados de fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos scFv se describen, por ejemplo, en Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88. Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos de cadena sencilla que presentan las características de un dominio V_H , es decir la capacidad de ensamblarse con un dominio V_L , o de un dominio V_L ligante de HER3, es decir la capacidad de ensamblarse conjuntamente con un dominio V_H con un sitio de unión a antígeno funcional y proporcionar de esta manera las propiedades de un anticuerpo según la invención.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir una región de unión, de ratón, y por lo menos una parte de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparado mediante técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable de ratón y una región constante humana resultan especialmente preferentes. Dichos anticuerpos quiméricos de rata/humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN codificantes de regiones variables de inmunoglobulina de rata y segmentos de ADN codificantes de regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" comprendidos por la presente invención son aquellas en las que la clase o subclase ha sido modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original. Dichos anticuerpos "quiméricos" también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección génica ahora bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Morrison S.L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855, 1984; patentes US n° 5.202.238 y n° 5.204.244.

La expresión "anticuerpo humanizado" o "versión humanizada de un anticuerpo" se refiere a anticuerpos en los que el marco o las "regiones determinantes de complementariedad" (RDC) han sido modificadas para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente de la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferente, las CDR del V_H y V_L se injertan en la región marco de un anticuerpo humano para preparar un "anticuerpo humanizado". Ver, por ejemplo, Riechmann L. *et al.*, *Nature* 332:323-327, 1988, y Neuberger M.S. *et al.*, *Nature* 314:268-270, 1985. Las marco variables de las cadenas pesada ya ligera pueden obtenerse de secuencias de anticuerpo humanas iguales o diferentes. Las secuencias de anticuerpo humano pueden ser secuencias de anticuerpos humanos naturales. Las regiones de marco variables de cadenas pesada y ligera humanas se listan en, por ejemplo, Lefranc M.-P., *Current Protocols in Immunology*, apéndice 1P A.1P.1-A.1P.37, 2000, y se encuentran accesibles mediante IMGT, el sistema internacional de información ImMunoGeneTics information system® (<http://imgt.cines.fr>) o en <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>. Opcionalmente la región marco puede modificarse con mutaciones adicionales. Las CDR particularmente preferentes corresponden a las que representan secuencias que reconocen los antígenos indicados anteriormente para los anticuerpos quiméricos. Preferentemente dicha versión humanizada se encuentra quimerizada con una región constante humana (ver, por ejemplo, las secuencias SEC ID n° 12 a n° 16). La expresión "anticuerpo humanizado" tal como se utiliza en la presente memoria comprende además dicho anticuerpos modificados en la región constante para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la unión de FcR, por ejemplo mediante "intercambio de clase", es decir, el cambio o la mutación de partes de Fc (por ejemplo de IgG1 a IgG4 y/o la mutación IgG1/IgG4).

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos del estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:368-374, 2001). También pueden producirse anticuerpos humanos en animales transgénicos (por ejemplo ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulinas de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes en la línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras el reto antigénico (ver, por ejemplo, Jakobovits A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555, 1993; Jakobovits A. *et al.*, *Nature* 362:255-258, 1993; Brüggemann, M.D. *et al.*, *Year Immunol.* 7: 33-40, 1993). También pueden producirse anticuerpos humanos en bibliotecas de expresión fágica (Hoogenboom, H.R. y Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227:381-388, 1992; Marks, J.D. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991). Las técnicas de Cole A. *et al.* y Boerner P. *et al.* también se encuentran disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole A. *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Liss A.L., página 77, 1985; y Boerner P. *et al.*, *J. Immunol.* 147:86-95, 1991). Tal como se ha indicado para los anticuerpos humanizados según la invención, la expresión "anticuerpo humano" tal como se utiliza en la presente memoria también comprende dichos anticuerpos modificados en la región constante para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la unión de FcR, por ejemplo mediante "intercambio de clase", es decir, el cambio o la mutación de partes de Fc (por ejemplo de IgG1 a IgG4 y/o la mutación IgG1/IgG4).

La expresión "anticuerpo recombinante humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped, tal como una célula NS0 ó CHO, o de un animal (por ejemplo un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o para anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped. Dichos anticuerpos recombinantes humanos presentan regiones variables y constantes en una forma reorganizada. Los anticuerpos recombinantes humanos según la invención han sido sometidos a hipermutación somática *in vivo*. De esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente en el repertorio *in vivo* de anticuerpos de la línea germinal humana.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "unión a HER3 humano", "de unión específicamente a HER3 humano" o "anticuerpo anti-HER3" son intercambiables y se refieren a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno HER3 humano con una afinidad de unión de valor K_D igual a $1,0 \times 10^{-8}$ moles/l o inferior a 25°C ; en una realización con un valor de K_D igual a $1,0 \times 10^{-9}$ moles/l o inferior a 25°C . La afinidad de unión se determina con un ensayo de unión estándar a 25°C , tal como la técnica de resonancia del plasmón superficial (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Suecia). Un método para determinar el valor de K_D de la afinidad de unión se indica en el Ejemplo 2b. De esta manera, un "anticuerpo ligante de HER3 humano" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo de unión específicamente al antígeno HER3 humano con una afinidad de unión de K_D igual a $1,0 \times 10^{-8}$ moles/l o inferior (preferentemente $1,0 \times 10^{-8}$ moles/l a $1,0 \times 10^{-12}$ moles/l) a 25°C .

La HER3 humana (ErbB-3, ERBB3, c-erbB-3, c-erbB3, receptor de tirosina-proteína quinasa erbB-3, SEC ID nº 17) codifica un elemento de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE) de receptor tirosina quinasa que incluye además HER1 (también conocido como RFCE), HER2 y HER4 (Kraus M.H. *et al.*, PNAS 86:9193-9197, 1989; Plowman G.D. *et al.* 87:4905-4909, 1990; Kraus M.H. *et al.*, PNAS 90:2900-2904, 1993). Al igual que el receptor del factor de crecimiento epidérmico prototípico, el receptor transmembrana HER3 consiste de un dominio extracelular de unión a ligando (DEC), un dominio de dimerización dentro de DEC, un dominio transmembrana, un dominio intracelular de proteína tirosina quinasa (DTQ) y un dominio C-terminal de fosforilación. Esta proteína unida a membrana presenta HER3 un dominio de unión a heregulina (HRG) en el dominio extracelular pero no un dominio de quinasa activo. Por lo tanto, puede unirse a dicho ligando pero no transmitir la señal al interior de la célula mediante fosforilación de proteínas. Sin embargo, forma heterodímeros con otros elementos de la familia de HER que sí presentan actividad de quinasa. La heterodimerización conduce a la activación de la ruta de señalización mediada por receptores y la trans-fosforilación de su dominio intracelular. La formación de dímero entre elementos de la familia de HER expande el potencial de señalización de HER3 y es un medio no sólo para la diversificación de la señal sino también para la amplificación de señales. Por ejemplo, el heterodímero HER2/HER3 induce una de las señales mitogénicas más importantes a través de la ruta PI3K y AKT entre los miembros de la familia de HER (Sliwkowski M.X., *et al.*, J. Biol. Chem. 269:14661-14665, 1994; Alimandi M *et al.*, Oncogene 10:1813-1821, 1995; Hellyer N.J., J. Biol. Chem. 276:42153-421561, 2001; Singer E., J. Biol. Chem. 276:44266-44274, 2001; Schaefer K.L., Neoplasia 8:613-622, 2006).

Los anticuerpos de HER3 mAb205.10.1, mAb205.10.2 y mAb205.10.3 mostraban unión competitiva respecto al ligando heregulina (HRG) a HER3.

La amplificación de dicho gen y/o la sobreexpresión de su proteína se han informado en numerosos cánceres, incluyendo los tumores de próstata, vejiga y mama. Se han caracterizado variantes alternativas de procesamiento transcripcional codificantes de diferentes isoformas. Una isoforma no presenta región intermembrana y se secreta al exterior de la célula. Esta forma actúa modulando la actividad de la forma unida a membrana. También se ha informado de variantes de procesamiento adicionales, aunque no se han caracterizado por completo.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipéptido capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En determinadas realizaciones, el determinante epítipo incluye grupos superficiales químicamente activos de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales sacáridas, fosforilo o sulfonilo y, en determinadas realizaciones, puede presentar características estructurales tridimensionales específicas, o presentar características de carga específica. Un epítipo es una región de un antígeno que se une a un anticuerpo.

La expresión "dominio variable de un anticuerpo según la invención" (dominio variable de un dominio variable de una cadena ligera (V_L), dominio variable de una cadena pesada (V_H)) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cada dominio de la pareja de dominios de cadena ligera y cadena pesada que participan directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada presentan la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias se encuentran ampliamente conservadas, conectadas mediante tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones marco adoptan una conformación de hoja β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de hojas β . Las CDR en cada cadena son mantenidas en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el sitio de unión de antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo desempeñan un papel particularmente

importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos según la invención y por lo tanto proporcionan un objetivo adicional de la invención.

La expresión "porción de unión a antígeno de un anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La parte de unión a antígeno de un anticuerpo comprende residuos aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad", o "CDR". La expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo de la invención contiene seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuyen en grados diversos a la afinidad del sitio de unión para el antígeno. Existen tres CDR de dominio variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDR de dominio variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). El término "CDR1H" se refiere a la región CDR1 de la región variable de cadena pesada calculada según Kabat. CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 se refieren a las regiones respectivas de la cadena pesada (P) o de la cadena ligera (L). La extensión de las regiones CDR y de marco (FR) se determina mediante comparación con una base de datos compilada a partir de secuencias de aminoácidos en las que dichas regiones se han definido según la variabilidad entre secuencias según Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991.

La "parte Fc" de un anticuerpo no participa directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que muestra diversas funciones efectoras. Una "parte Fc de un anticuerpo" es una expresión bien conocida por el experto en la materia y definida basándose en el corte con papaína de los anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Según las regiones constantes de cadena pesada, las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , and μ , respectivamente. La parte Fc de un anticuerpo participa directamente en la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y en la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) basadas en la activación del complemento, la unión de C1q y la unión del receptor Fc. La expresión "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a un proceso iniciado por la unión del factor del complemento C1q a la parte Fc de la mayoría de subclases de anticuerpo IgG. La unión de C1q a un anticuerpo está provocada por interacciones proteína-proteína definidas en el denominado sitio de unión. Dichos sitios de unión son conocidos del estado de la técnica y se describen en, por ejemplo, Boakle R.J. *et al.*, *Nature* 282:742-743, 1979; Lukas T.J. *et al.*, *J. Immunol.* 127:2555-2560, 1981; Brunhouse R. y Cebra J.J., *Mol. Immunol.* 16:907-17, 1979; Burton D.R. *et al.*, *Nature* 288:338-344, 1980; Thommesen J.E. *et al.*, *Mol. Immunol.* 37:995-1004, 2000; Idusogie E.E. *et al.*, *J. Immunol.* 164:4178-4184, 2000; Hezareh M. *et al.*, *J. Virology* 75:12161-12168, 2001; Morgan A. *et al.*, *Immunology* 86:319-324, 1995, patente EP n° 0 307 434. Dichos sitios de unión son, por ejemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (la numeración sigue el índice EU de Kabat, ver posteriormente). Los anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 habitualmente muestran activación del complemento y la unión a C1q y C3, mientras que IgG4 no activa el sistema de complemento y no se une a C1q y C3.

En una realización, el anticuerpo según la invención puede comprender una parte Fc derivada de origen humano y preferentemente todas las demás partes de las regiones constantes humanas. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "parte Fc derivada de origen humano" se refiere a una parte Fc que es una parte Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1 o IgG2, o IgG3 o IgG4, por ejemplo una parte Fc de subclase IgG1, una parte Fc mutada de subclase IgG1 humana (preferentemente con una mutación en L234A + L235A), una parte Fc de la subclase IgG4 humana o una parte Fc mutada de la subclase IgG4 humana (preferentemente con una mutación en S228P). Resultan preferentes las regiones constantes de cadena pesada humanas de SEC ID n° 13 (subclase IgG1 humana), SEC ID n° 14 (subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A).

En una realización, el anticuerpo según la invención es de la subclase IgG1 o de la subclase IgG3 humana. En una realización, el anticuerpo según la invención es de la subclase IgG1 humana.

En una realización, el anticuerpo según la invención se caracteriza porque las cadenas constantes son de origen humano. Dichas regiones constantes son bien conocidas del estado de la técnica y son descritas por, por ejemplo, Kabat E.A. (ver, por ejemplo, Johnson G. y Wu T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218). Por ejemplo, una región constante de cadena pesada humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID n° 13. Por ejemplo, una región constante de cadena ligera humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa de SEC ID n° 12.

El término "aminoácido" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al grupo de carboxi α -aminoácidos naturales que comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P.), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

Las expresiones "ácido nucleico" o "molécula de ácidos nucleicos", tal como se utilizan en la presente memoria, pretenden incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácidos nucleicos puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, aunque preferentemente es ADN de doble cadena. Un ácido nucleico se encuentra "operablemente ligado" en el caso de que se sitúe en una relación funcional con otro ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretorio se encuentra operablemente ligado a ADN de un polipéptido en el caso de que se exprese en forma de preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecte a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se encuentre situado de manera que facilite la traducción. Generalmente, "operablemente ligado" significa que las secuencias de ADN que resultan ligadas son colineales y, en el caso de un líder secretorio, contiguas y en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no son necesariamente contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligación en sitios de restricción apropiados. En el caso de que no existan dichos sitios, se utilizan adaptadores o conectores oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional. Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan intercambiamente y todas dichas expresiones incluyen la progenie. De esta manera, las expresiones "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primario y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida la progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado realizado en la célula originalmente transformada.

El anticuerpo según la invención preferentemente se caracteriza porque las cadenas constantes son de origen humano. Dichas cadenas constantes son bien conocidas del estado de la técnica y se describen en, por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Por ejemplo, una región constante de cadena ligera humana útil que comprende una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa de secuencia SEC ID nº 12. Por ejemplo, una región constante de cadena pesada humana útil comprende las secuencias SEC ID nº 13 a nº 16.

Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo según la invención.

Entre los anticuerpos según la invención se incluyen, además, anticuerpos que presentan "modificaciones de secuencia conservadoras" (anticuerpos variantes), modificaciones de secuencia de nucleótidos y de aminoácidos que no afectan o alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo según la invención. Pueden introducirse modificaciones mediante técnicas estándares conocidas de la técnica, tales como la mutagénesis dirigida a sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Entre las sustituciones conservadoras de aminoácidos se incluyen aquéllas en las que se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica las familias de residuos aminoácidos que presentan cadenas laterales similares. Entre estas familias se incluyen los aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De esta manera, un residuo aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-HER3 humano puede sustituirse preferentemente por otro residuo aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Por lo tanto, un anticuerpo anti-HER3 "variante" se refiere en la presente memoria a una molécula que presenta una secuencia de aminoácidos diferente de una secuencia "parental" de aminoácidos de anticuerpo anti-HER3 en hasta diez, preferentemente en aproximadamente entre dos y aproximadamente cinco adiciones, deleciones y/o sustituciones en una o más regiones variables del anticuerpo parental.

Pueden llevarse a cabo sustituciones de aminoácidos mediante mutagénesis basándose en el modelaje molecular, tal como describen Riechmann L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1988, y Queen C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-HER3, en el que el anticuerpo comprende un VH tal como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente y un VL tal como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y de VL en SEC ID nº 8 y SEC ID nº 10, respectivamente, incluyendo modificaciones post-traduccionales de dichas secuencias, y que presentan una o más de las propiedades siguientes (determinadas en ensayos tal como se indican en los Ejemplos 3 y 2):

- el anticuerpo anti-HER3 inhibe la fosforilación de HER3 en células tumorales tales como células MCF7, células FaDu o células Mel-Juso (en una realización, el anticuerpo anti-HER3 muestra una inhibición de la fosforilación de HER3 en las células MCF7 de por lo menos 80% (en una realización, de por lo menos 90%) a una concentración de 1,0 µg/ml; en una realización, el anticuerpo anti-HER3 muestra una inhibición de la fosforilación de HER3 en células FaDu de por lo menos 80% (en una realización, de por lo menos 90%) a una concentración de 0,1 µg/ml; en

una realización, el anticuerpo anti-HER3 muestra una inhibición de la fosforilación de HER3 en células Mel-Juso de por lo menos 60% (en una realización, de por lo menos 70%) a una concentración de 0,1 µg/ml).

5 - el anticuerpo anti-HER3 inhibe la fosforilación de AKT en células tumorales tales como la célula Mel-Juso (en una realización, el anticuerpo anti-HER3 inhibe la fosforilación de AKT en células Mel-Juso con un valor de IC₅₀ inferior a 0,50 µg/ml; en una realización, con un valor de IC₅₀ inferior a 0,35 µg/ml).

10 - el anticuerpo anti-HER3 inhibe la proliferación de células tumorales tales como las células MDA-MB-175 (en una realización, el anticuerpo anti-HER3 inhibe la proliferación de las células MDA-MB-175 con un valor de IC₅₀ inferior a 10 µg/ml).

-el anticuerpo anti-HER3 se une a HER3 con un valor de K_D inferior a 5,0x10⁻⁹ M; en una realización, con un valor de K_D inferior a 3,0x10⁻⁹ M.

15 La identidad u homología con respecto a la secuencia se define en la presente memoria como el porcentaje de residuos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los de la secuencia parental, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas en la secuencia del anticuerpo debe interpretarse que afecta a la identidad o a la homología de secuencia. La variante conserva la
20 capacidad de unirse al dominio variable de la HER3 humana y preferentemente presenta propiedades que son superiores a las del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante puede presentar efectos secundarios reducidos durante el tratamiento.

25 Un anticuerpo "parental" ejemplar comprende las regiones CDR del anticuerpo mAb 205.10.2 y preferentemente se utiliza para la preparación de la variante. Preferentemente, el anticuerpo parental presenta una región marco humana y, en caso de encontrarse presente, dominios constantes de anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

30 La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" se refiere a la lisis de células diana humanas por un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras. La ADCC se mide preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células expresantes de HER3 con un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras, tales como las PBMC recién aisladas o células efectoras purificadas a partir de capas leucocitarias, por ejemplo monocitos o células asesinas naturales (NK) o una línea celular de NK de crecimiento continuo.

35 Las funciones efectoras mediadas por células, tal como la ADCC de los anticuerpos monoclonales, pueden potenciarse mediante la manipulación de su componente oligosacárido, tal como se describe en Umana P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999, y la patente US nº 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos terapéuticos utilizados más habitualmente, son glucoproteínas que presentan un sitio N-ligado de glucosilación conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos a Asn297 se encuentran enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia resulta esencial para que el anticuerpo medie en funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely M.R. *et al.*, Glycobiology 5:813-822, 1995; Jefferis R. *et al.*, Immunol. Rev. 163:59-76, 1998; Wright A. y Morrison S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32). Umana, P. *et al.* Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999, y el documento nº WO 99/54342 mostraron que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de la β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, incrementaba significativamente la actividad de ADCC *in vitro* de los anticuerpos. Las alteraciones en la composición del carbohidrato de Asn297 o su eliminación también afecta a la unión a FcγR y a C1q (Umana P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999; Davies, J. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 74:288-294, 74; Mimura, Y. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:45539-45547, 2001; Radaev, S. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:16478-16483, 2001; Shields, R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001; Shields, R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 277:26733-26740, 2002; Simmons, L.C. *et al.*, J. Immunol. Methods 263:133-147, 2002.

55 Los métodos de potenciación de las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales mediante glucomanipulación se informan en los documentos nº WO 2005/044859, nº WO 2004/065540 y nº WO 2007/031875; Umana P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999; documentos nº WO 99/154342, nº WO 2005/018572, nº WO 2006/116260, WO nº WO 2006/114700, nº WO 2004/065540, nº WO 2005/011735, nº WO 2005/027966, nº WO 1997/028267, nº US 2006/0134709, nº US 2005/0054048, nº US 2005/0152894, nº WO 2003/035835 y nº WO 2000/061739, Niwa R. *et al.*, J. Immunol. Methods 306:151-160, 2005; Shinkawa T. *et al.*, J. Biol. Chem. 278:3466-3473, 2003; documentos nº WO 03/055993 y nº US 2005/0249722.

60 En una realización de la invención, el anticuerpo según la invención se encuentra afucosilado, lo que significa que el anticuerpo se encuentra glucosilado (en el caso de que comprenda una parte Fc de la subclase IgG1 o IgG3) con una cadena sacárida en Asn297, de manera que la cantidad de fucosa en dicha cadena sacárida sea de 80% o inferior (numeración según Kabat), por ejemplo de entre 80% y 1%. En otra realización, la cantidad de fucosa dentro
65

de dicha cadena sacárida es 65% o inferior, en una realización de entre 5% y 65%, y en una realización la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena sacárida es 0%. Dichos anticuerpos se denominan en lo sucesivo “anticuerpos afucosilados” o “anticuerpos no fucosilados”. Dichos anticuerpos afucosilados muestran una ADCC incrementada, mientras que otras propiedades de anticuerpos permanecen sustancialmente no afectadas

En una realización adicional, la cantidad de ácido N-glucolilneuramínico (NGNA) es de 1% o menos, y/o la cantidad de alfa-1,3-galactosa N-terminal es de 1% o inferior dentro de dicha cadena sacárida. La cadena sacárida muestra preferentemente las características de los glicanos N-ligados unidos a Asn297 de un anticuerpo expresado recombinantemente en una célula CHO.

El término “Asn297” según la invención se refiere al aminoácido asparagina situado en aproximadamente la posición 297 en la región de Fc. Basado en variaciones de secuencia menores de los anticuerpos, Asn297 también puede encontrarse localizado en algunos aminoácidos (habitualmente no más de 63 aminoácidos) cadena arriba o abajo de la posición 297, es decir entre la posición 294 y 300.

La expresión “las cadenas sacáridas muestran características de glicanos N-ligados unidos a Asn297 de un anticuerpo expresado recombinantemente en una célula CHO” se refiere a que la cadena sacárida en Asn297 del anticuerpo parental de longitud completa según la invención presenta la misma estructura y secuencia de residuos sacáridos, excepto por el residuo fucosa, que los del mismo anticuerpo expresado en células CHO no modificadas, por ejemplo que las células de las que se informa en el documento nº WO 2006/103100.

El término “NGNA” tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al residuo sacárido ácido N-glucolilneuramínico.

La glucosilación de IgG1 o IgG3 humana se produce en Asn297 en forma de glucosilación nuclear de oligosacárido complejo biantenarico fucosilado terminado en, como máximo, dos residuos Gal. Las regiones constantes de cadena pesada humana de la subclase IgG1 o IgG3 se informan en detalle en Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), y en Brüggemann M. *et al.*, J. Exp. Med. 166:1351-1361, 1987; Love T.W. *et al.*, Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527. Estas estructuras se denominan G0, G1 (α -1,6- o α -1,3-) o residuos glicanos G2, dependiendo de la cantidad de residuos Gal terminales (Raju T.S., Bioprocess Int. 1 (2003) 44-53). La glucosilación de tipo CHO de partes Fc de anticuerpo se describe en, por ejemplo, Routier, F.H., Glyconjugate J. 14:201-207, 1997. Los anticuerpos que se expresan recombinantemente en células CHO huésped no glucomodificadas habitualmente se encuentran fucosiladas en Asn297 en una proporción de por lo menos 85%. Los oligosacáridos modificados del anticuerpo parental de longitud completa pueden ser híbridos o complejos. Preferentemente, los oligosacáridos bifurcados, reducidos/no fucosilados son híbridos. En otra realización, los oligosacáridos bifurcados reducidos/no fucosilados son complejos.

Según la invención, “cantidad de fucosa” se refiere a la cantidad de dicho azúcar dentro de la cadena sacárida en Asn297, relacionado con la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo estructuras complejas, híbridas y ricas en manosa) medidas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (por ejemplo en el sistema CL/EM) y calculado como un valor medio (ver, por ejemplo, el documento nº WO 2008/077546). La cantidad relativa de fucosa es el porcentaje de estructuras que contienen fucosa en relación a la totalidad de las glucoestructuras identificadas en una muestra tratada con N-glucosidasa F (por ejemplo estructuras complejas, híbridas y estructuras de bajo y alto contenido en manosa, resp.) mediante MALDI-TOF.

Los anticuerpos según la invención preferentemente se producen por medios recombinantes. Dichos métodos son ampliamente conocidos del estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procarióticas y eucarióticas con el posterior aislamiento del polipéptido anticuerpo y habitualmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, se insertan ácidos nucleicos codificantes de cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de las mismas en vectores de expresión mediante métodos estándares. La expresión se lleva a cabo en células huésped procarióticas o eucarióticas apropiadas, tales como las células CHO, las células NS0, las células SP2/0, las células HEK293, las células COS, las levaduras o las células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera a partir de las células (del sobrenadante o tras la lisis de las células). La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida del estado de la técnica y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides S.C., Protein Expr. Purif. 17:183-202, 1999; Geisse S. *et al.*, Protein Expr. Purif. 8:271-282, 1996; Kaufman R.J., Mol. Biotechnol. 16:151-161, 2000; Werner R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880. Los anticuerpos pueden encontrarse presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o en forma sustancialmente pura. Se lleva a cabo la purificación con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares, incluyendo la cromatografía de columna y otras bien conocidas de la técnica (ver Ausubel F. *et al.*, editor, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987). La expresión en células NS0 se describe en, por ejemplo, Barnes, L.M. *et al.*, Cytotechnology 32:109-123, 2000; Barnes, L.M. *et al.*, Biotech. Bioeng. 73:261-270, 2001. La expresión transitoria se describe en, por ejemplo, Durocher, Y. *et al.*, Nucl. Acids Res. 30:E9, 2002. Se describe la clonación de dominios variables en Orlandi R. *et al.*,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837, 1989; Carter P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289, 1992; Norderhaug L. *et al.*, J. Immunol. Methods 204:77-87, 1997. Un sistema de expresión transitoria preferente (HEK293) se describe en Schlaeger E.-J. y Christensen K., Cytotechnology 30:71-83, 1999, y en Schlaeger E.-J., J. Immunol. Methods 194:191-199, 1996. Se separan convenientemente anticuerpos monoclonales del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, proteína A-seferosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y ARN codificante de los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencian fácilmente mediante procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dicho ADN y ARN. Tras el aislamiento, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que seguidamente se transfectan en células huésped, tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped. Son realizaciones preferentes de la invención los anticuerpos obtenibles de dichas líneas celulares. Los anticuerpos afucosilados se preparan preferentemente mediante glucomanipulación tal como se ha indicado anteriormente.

Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-HER3 humano mediante la introducción de cambios apropiados de nucleótidos en el ADN codificante del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Sin embargo, estas modificaciones únicamente pueden llevarse a cabo bajo condiciones muy limitadas, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo, tales como el isotipo de IgG y la unión de epítopos, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación. También puede sustituirse cualquier residuo cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo anti-HER3, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar entrecruzamientos aberrantes. A la inversa, pueden añadirse uno o más enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente en el caso de que el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv). Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón original de glucosilación del anticuerpo. El término "alteración" se refiere a eliminar una o más fracciones carbohidrato presentes en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no se encuentran presentes en el anticuerpo. La glucosilación de los anticuerpos típicamente es ligada a N. La expresión "ligada a N" se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. De esta manera, la presencia de cualquier de dichas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptido anteriormente indicadas (para los sitios de glucosilación ligada a N).

Las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-HER3 se preparan mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Entre estos métodos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o sitio-dirigida), la mutagénesis por PCR y la mutagénesis por inserción de casete de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante de anticuerpo anti-HER3 humanizado.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende unir el anticuerpo a uno de entre una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxilalquilenos, de la manera indicada en las patentes US nº 4.640.835, nº 4.496.689, nº 4.301.144, nº 4.670.417, nº 4.791.192 y nº 4.179.337.

Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras según la invención se combinan con secuencias de promotor, de inicio de traducción, región constante, región 3' no traducida, de poliadenilación y de terminación de transcripción para formar constructos de vector de expresión. Los constructos de expresión de cadena pesada y de cadena ligera pueden agruparse en un único vector, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse separadamente en células huésped que seguidamente se fusionan para formar una única célula huésped que exprese ambas cadenas.

Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención. Otro aspecto de la invención es la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica. Un aspecto adicional de la invención es un método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo según la presente invención, formulado conjuntamente con un portador farmacéutico.

Además, los anticuerpos anti-HER3 según la invención han resultado ser especialmente útiles para el tratamiento del cáncer.

Por lo tanto, un aspecto de la invención es dicha composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo según la invención para el tratamiento del cáncer.

5 Otro aspecto de la invención es la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es un método para el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer mediante la administración de un anticuerpo según la invención en dicho paciente que necesita dicho tratamiento.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéutico" incluye cualquiera y la totalidad de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador resulta adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo mediante inyección o infusión).

15 Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Tal como apreciará el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención mediante determinadas vías de administración, puede resultar necesario recubrir el compuesto con un material, o coadministrar el compuesto con un material, para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse en un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo liposomas o un diluyente. Entre los diluyentes farmacéuticamente aceptables se incluyen solución salina y soluciones tamponadoras acuosas. Entre los portadores farmacéuticos se incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocida de la técnica.

20 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitarse a las mismas, las inyecciones e infusiones intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

25 El término "cáncer" tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a cáncer pulmonar, cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP), cáncer pulmonar de células bronquioloalveolares, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de los tubos de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasmas del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tallo cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma pituitario, linfoma, leucemia linfocítica, incluyendo versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriormente indicados, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriormente indicados. Preferentemente, dicho cáncer es un cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de la cabella o cuello, o cáncer pancreático, preferentemente cáncer pulmonar, cáncer de cabeza o cuello, o cáncer pancreático. Preferentemente, dichos cánceres se caracterizan adicionalmente mediante expresión o sobreexpresión de HER3, más preferentemente mediante sobreexpresión de HER3.

30 Dichas composiciones pueden contener además adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede resultar deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, puede conseguirse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Con independencia de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de administración farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

40 Los niveles reales de las dosis de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden modificarse de manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que resulte eficaz para

conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin resultar tóxicos para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención utilizadas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se utiliza, la duración del tratamiento, otros fármacos, los compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, sexo, peso, condición, estado de salud general e historia médica del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos de la técnica médica.

La composición debe ser estéril y líquida en grado suficiente para que la composición resulte administrable mediante jeringa. Además de agua, el portador preferentemente es una solución salina tamponada isotónica.

Puede mantenerse la fluidez correcta, por ejemplo mediante la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante la utilización de surfactantes. En muchos casos, resulta preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, y cloruro sódico en la composición.

Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a comprender la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos proporcionados.

Descripción del listado de secuencias

SEC ID nº 1	CDR3H de cadena pesada, mAb 205.10
SEC ID nº 2	CDR2H de cadena pesada, mAb 205.10
SEC ID nº 3	CDR1H de cadena pesada, mAb 205.10
SEC ID nº 4	CDR3L de cadena ligera, mAb 205.10
SEC ID nº 5	CDR2L de cadena ligera, mAb 205.10
SEC ID nº 6	CDR1L de cadena ligera (variante 1), mAb 205.10
SEC ID nº 7	CDR1L de cadena ligera (variante 2), mAb 205.10
SEC ID nº 8	dominio variable de cadena pesada V _H , mAb 205.10
SEC ID nº 9	dominio variable de cadena ligera V _L , mAb 205.10.1
SEC ID nº 10	dominio variable de cadena ligera V _L , mAb 205.10.2
SEC ID nº 11	dominio variable de cadena ligera V _L , mAb 205.10.3
SEC ID nº 12	región constante de cadena ligera kappa humana
SEC ID nº 13	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG1
SEC ID nº 14	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG1 mutada en L234A y L235A
SEC ID nº 15	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG4
SEC ID nº 16	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG4 mutada en S228P
SEC ID nº 17	HER3 humano

Descripción de las figuras

Figura 1A y B	Porcentaje (%) de inhibición de anticuerpos anti-HER3 de la fosforilación de receptores en células MCF7 a diferentes concentraciones.
Figura 1C	Porcentaje (%) de inhibición de anticuerpos anti-HER3 de la fosforilación de receptores en células Mel-Juso a diferentes concentraciones.
Figura 2	El tratamiento con mAb 205 (10 mg/kg q7dx3, i.p.) resultó en la estabilización del tumor de xenoinjertos trasplantados FaDu de CCCCE.
Figura 3	El tratamiento con mAb 205 (10 mg/kg q7d, i.p.) resultó en la estabilización tumoral de xenoinjertos trasplantados de cáncer de mama MAXF449.
Figura 4	El tratamiento con mAb 205 (25 mg/kg q7d, i.p.) resultó en la estabilización tumoral de xenoinjertos trasplantados 7177 de CCCCE.

Ejemplos

Ejemplo 1

Inmunización

Se inmunizaron ratones NMRI con HER3_h-DEC (del propio laboratorio de los presentes inventores) y recibieron un refuerzo de HER3_h-DEC. Se realizó un seguimiento de la respuesta inmunológica mediante ensayo de muestras de suero frente a la ELISA de HER1/2/3-DEC. Se congelaron células de bazo de ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina anti-HER3 para la inmortalización posterior mediante fusión con la línea celular de mieloma de ratón P3X63 Ag8.653. Se realizó una fusión y los sobrenadantes de hibridoma se cribaron mediante ELISA-HER1/2/-ECD, no mostrando reactividad cruzada, pero sí unión a HER3-ECD y se seleccionaron los hibridomas selectivos

- para anti-HER3. Los hibridomas relevantes se clonaron mediante separación FACS de células individuales. Se cultivaron *in vitro* clones de células individuales procedentes de diferentes hibridomas para producir anticuerpos en medio de cultivo de tejidos para la caracterización. Se seleccionaron anticuerpos mediante la determinación de su capacidad de inhibir la fosforilación de HER3, la fosforilación de AKT y la inhibición de la proliferación de células tumorales de las células MDA-MB-175 (ver los Ejemplos, posteriormente). De entre los anticuerpos obtenidos, uno se humanizó adicionalmente para proporcionar los anticuerpos siguientes: mAb 205.10.1, mAb 205.10.2 y mAb 205.10.3 con sus V_H y V_L o los CDR respectivos.

Anticuerpo	V _H	V _L
mAb 205.10.1	SEC ID nº 8	SEC ID nº 9
mAb 205.10.2	SEC ID nº 8	SEC ID nº 10
mAb 205.10.3	SEC ID nº 8	SEC ID nº 11

- 10 En una realización, dichos anticuerpos se prepararon utilizando regiones constantes de origen humano, por ejemplo SEC ID nº 12 a nº 13.

Ejemplo 2

15 Ensayos de unión

a) ELISA específico de antígeno para la unión a HER3-DEC humano

- 20 Se capturó en una placa de estreptavidina dominio extracelular de HER3 humano soluble fusionado con proteína de unión a estreptavidina (PUE). Para definir la unión óptima del anticuerpo a SPB-CDCP1, se recubrieron placas de poliestireno de 384 pocillos (NUNC, recubiertas con estreptavidina) suministradas por MicroCoat, Bernried, Alemania (ID nº 1734776-001) con sobrenadante de HEK293 puro diluido en etapas (en tampón BSA/IMDM: 100 mg de BSA fracción V, Roche 10735078001, disuelto en medio de Dulbecco modificado por Iscove). Utilizando una curva de calibración en el ratón de anticuerpos 205 quiméricos, se identificó el factor de dilución óptimo del sobrenadante de HEK293 en relación a la capacidad de unión de la estreptavidina de la placa de microtitulación. Para el recubrimiento estándar, se diluyó sobrenadante de HEK293 que contenía SBP-HER3 (entre 1:15 y 1: 40) y se incubó durante la noche a una temperatura de entre 2°C y 80°C (25 µl en cada pocillo). Resulta necesario el lavado intensivo de la placa de microtitulación para eliminar el SBP-HER3 no unido restante.
- 30 Los anticuerpos según el anticuerpo de la invención se sometieron a ensayo no diluidos o utilizando una dilución en 12 etapas. Se incubaron 12,5 µl por pocillo de cada muestra durante 90 minutos a temperatura ambiente. Tras el lavado intensivo con PBS-T (Tween-20 al 0,1% en PBS), se añadieron 25 µl de anticuerpos de cabra anti-IgG humana acoplado con PRP (Jackson ImmunoResearch, nº de código 109-036-098, dilución 1:10.000) o anticuerpos humanos y se incubaron durante 1 hora. Tras el lavado intensivo, se detectó la unión de los anticuerpos con tabletas de ABTS (Roche Diagnostics GmbH, nº de cat. 1112422). Se midió la absorbancia a 405 nm/492 nm utilizando un fotómetro estándar.

La tabla muestra las proporciones de unión relativas de los diferentes anticuerpos.

anticuerpo	ELISA de HER3_h-DEC c (µg/ml)	ELISA de HER3 c (µg/ml)	(proporción de unión a HER3_h-DEC/IgG)
mAb 205.10.1	583,1	785,0	0,74
mAb 205.10.2	396,4	508,0	0,78
mAb 205.10.3	505,4	608,4	0,83

- 40 b) Caracterización de la unión de anticuerpos anti-HER3 a un fragmento de dominio extracelular (ECD) de HER3 humano mediante análisis Biacore:

- 45 Para las mediciones de afinidad, se acoplaron 30 µg/ml de anticuerpos anti-Fcγ (de cabra, Jackson ImmunoResearch) a la superficie de un chip sensor CM-5 mediante acoplamiento de aminas estándar y reacciones de bloqueo en un instrumento SPR (Biacore T100). Tras la conjugación, se inyectaron anticuerpos anti-HER3 a 25°C a un caudal de 5 µl/minuto, seguido de una serie de dilución (0 nM a 1.000 nM) de HER3 DEC humano a 30 µl/minuto. A modo de tampón de migración para el experimento de unión se utilizó PBS/BSA al 0,1%. A continuación se regeneró el chip con un pulso de 60 segundos de solución de glicina-HCl 10 mM, pH 2,0.

Se calcularon los parámetros termodinámicos (K_D, constante de unión a HER3) utilizando un modelo de unión Langmuir 1:1.

Anticuerpo	Afinidad de unión K _D [M]
mAb 205.10.1	2,0x 10 ⁻⁹

mAb 205.10.2	1,1x10 ⁻⁹
mAb 205.10.3	2,0x10 ⁻⁹

En un ensayo de unión competitiva (Biacore), mAb205.10.1, mAb205.10.2 y mAb205.10.3 mostraron todos unión al mismo epítipo. Los anticuerpos anti-HER3 U1-7, U-53 y U1-59 descritos en la patente WO n° 2007/077028 y Antic. n° 6 descrito en la patente WO n° 2008/100624 se investigaron en dicho ensayo y se reveló que se unían a diferentes epítopos que los anticuerpos Mab205.10.1, Mab205.10.2 y Mab205.10.3

Ejemplo 3

a) Inhibición de la fosforilación de HER3 en células MCF7, FaDu y Mel-Juso

Se llevaron a cabo ensayos en células MCF7 y FaDu según el protocolo siguiente: Se sembraron 500.000 células/pocillo en una placa de 6 pocillos recubierta con poli-D-lisina en medio RPMI1640 con FCS al 10%. Se incubaron durante 24 horas. Se separó el medio mediante aspiración, se incubó durante la noche con 500 µl/pocillo de RPMI1640 con FCS al 0,5%. Se añadieron anticuerpos en 500 µl de RPMI 1640 con FCS al 0,5%. Se incubaron durante 1 hora. Se añadió HRG-1b (concentración final: 500 ng/ml) durante 10 minutos. Para lisar las células, se eliminó el medio y se añadieron 80 µl de tampón de lisis celular Triton-X-100 helado y se incubó durante 5 minutos sobre hielo. Tras transferir el lisado a tubos de reacción de 1,5 ml y centrifugar a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se transfirió el sobrenadante a tubos de reacción nuevos. Tubos iguales que contenían cantidades iguales de proteína en tampón de carga SDS se separaron en SDS PAGE y se transfirieron mediante la utilización de transferencia Western semiseca a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con tampón 1xNET + gelatina al 0,25% durante 1 hora y se detectó pHER3 con el anticuerpo αPhospho-HER3/ErbB3 (Tyr1289)(21D3), Cell Signaling, n° 4791, y HER3 con el anticuerpo αErbB3 (C-17), Santa Cruz, n° sc-285, respectivamente. Tras el lavado y la detección de las señales con un anticuerpo secundario acoplado a POD, las bandas se escanearon densitométricamente. Se investigaron los anticuerpos anti-HER3 Mab205.10.1, Mab205.10.2 y Mab205.10.3 y también los anticuerpos anti-HER3 U1-7, U-53 y U1-59 indicados en la patente WO n° 2007/077028 y Ab n° 6, descrito en la patente WO n° 2008/100624. Se muestra a continuación y en la fig. 1A, el porcentaje (%) de inhibición de los anticuerpos anti-HER3 tras la fosforilación del receptor en células MCF7.

% de inhibición de la fosforilación de HER3 en células MCF7

Anticuerpo	pHER3, % de inhibición [0,1 µg/ml]	pHER3, % de inhibición [1,0 µg/ml]
control	0	0
mAb205.10.2	62	96
U1-7	36	44
U1-53	54	51
U1-59	15	70
Antic. n° 6	13	64

En un experimento adicional, se investigó el anticuerpo anti-HER3 mAb205.10.2, y también los anticuerpos anti-HER3 8B8.2D9 indicados en el documento n° WO 97/35885, y 1B4C3 y 2D1D12, indicados en el documento n° WO 2003/013602. Se muestra a continuación y en la fig. 1B, el porcentaje (%) de inhibición de los anticuerpos anti-HER3 tras la fosforilación del receptor en células MCF7.

% de inhibición de la fosforilación de HER3 en células MCF7

Anticuerpo	pHER3, % de inhibición [0,1 µg/ml]	pHER3, % de inhibición [1,0 µg/ml]
control	0	0
mAb205.10.2	68	91
8B8.2D9	13	28
1B4C3	49	46
2D1D12	34	34

El porcentaje (%) de inhibición de los anticuerpos anti-HER3 de la fosforilación del receptor en las células FaDu se muestra a continuación.

% de inhibición de la fosforilación de HER3 en células FaDu

Anticuerpo	pHER3, % de inhibición [0,03 µg/ml]	pHER3 % de inhibición [0,10 µg/ml]	pHER3 % de inhibición [0,30 µg/ml]
control	0	0	0
mAb205.10.2	88	93	97
U1-59	31	25	90

En un experimento adicional, se investigó el anticuerpo anti-HER3 mAb205.10.2, y también los anticuerpos anti-HER3 8B8.2D9 indicados en el documento nº WO 97/35885, y 1B4C3 y 2D1D12, indicados en el documento nº WO 2003/013602, y 105.5 de Millipore (nº de cat. 05-47, denominado α -HER^{ECD} en el documento nº WO 2003/013602), en células Mel-Juso. Se llevaron a cabo ensayos en células Mel-Juso según el protocolo anteriormente indicado para las células MCF7 y FaDu. Se adaptaron los números de células y volúmenes de medio a las placas de 12 pocillos. El porcentaje (%) de inhibición de los anticuerpos anti-HER3 de la fosforilación de receptores en células Mel-Juso se muestra a continuación y en la figura 1C.

% de inhibición de la fosforilación de HER3 en células Mel-Juso

Anticuerpo	pHER3, % de inhibición [0,1 µg/ml]	pHER3, % de inhibición [1,0 µg/ml]
control	0	0
mAb205.10.2	75,9	78,8
105.5 (α -HER-DEC)	22,2	19,5
8B8.2D9	31,3	20,3
1B4C3	20,7	17,5
2D1D12	3,4	39,3

b) Fosforilación de AKT (ELISA)

Se llevaron a cabo ensayos en células MCF7 según el protocolo siguiente: se sembraron células MCF7 a 30.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos recubierta con poli-D-lisina en medio RPMI 1640 con FCS al 10% y se incubaron durante 24 h. Se eliminó el medio mediante golpeo suave en un trozo de papel limpio, se lavó cuidadosamente con 200 µl de medio libre de suero, se incubó durante la noche con 100 µl/pocillo de RPMI 1640 con FCS al 0,5%. Se eliminó el medio tal como se ha indicado anteriormente, se añadieron anticuerpos a 100 µl de RPMI 1640 con FCS al 0,5% y se incubó durante 1,5 h. Se añadió HRG-1b (concentración final: 5 ng/ml) durante 10 minutos. Se eliminó el medio tal como se ha indicado anteriormente. Para lisar las células, se añadieron 100 µl de tampón de lisis celular helado y se resuspendieron mediante pipeteado aproximadamente 5x. Se centrifugó la placa a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se transfirieron 80 µl de sobrenadante (o alícuotas) a una placa de polipropileno nueva y se congeló instantáneamente en N₂ liq. Se almacenaron a -80°C hasta el ensayo.

Se añadieron muestras del kit de ensayo EIA AKT1,2(fosfo-Ser473) nº 900-162 (diluidas 1:10) a la placa recubierta con un MAB de ratón específico para el extremo terminal de AKT. Se incubó durante 1 hora a TA bajo agitación. Lavado 5x, incubación con anti-fosfo-AKT(Ser473) biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación. Lavado 5x, incubación con conjugado de estreptavidina-HRP durante 30 minutos a TA bajo agitación. Lavado 5x, incubación con sustrato TMB durante 30 minutos a TA bajo agitación. Se detuvo la reacción y se leyó a 450 nm.

El anticuerpo mAb 205.10.2 mostró una IC₅₀ de la inhibición de la fosforilación de AKT de 0,06 µg/ml.

En una ELISA de pAKT en células Mel-Juso realizada tal como se ha indicado para las células MCF7, el mAb 205.10.2 mostró una IC₅₀ de la inhibición de la fosforilación de AKT de 0,28 µg/ml. Todos los demás anticuerpos analizados mostraron una IC₅₀ superior (>) a 50.

% de inhibición de la fosforilación de AKT en células Mel-Juso

Anticuerpo	IC ₅₀ [µg/ml]
mAb 205.10.2	0,28
105.5 (α -HER-DEC)	0,81
1B4C3	>50
2D1D12	>50
8B8D9	>50

c) Inhibición de la proliferación de células tumorales

Se evaluó la eficacia antitumoral de los anticuerpos de HER3 mAb205.10.1, mAb205.10.2 y mAb205.10.3 en un ensayo de proliferación celular utilizando células MDA-MB-175 (células de carcinoma mamario humano VII, ATCC nº de catálogo HTB-25). Se sembraron 20.000 células por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos estériles con medio de cultivo celular DMEM/F12 que contenía FCS al 10% y se incubaron a 37°C±1°C con 5%±61% de CO₂ durante un día. Las células eran de crecimiento lento, con un tiempo de doblado de aproximadamente 1,5 días. Se añadieron anticuerpos anti-HER3 en una serie de dilución y se incubaron adicionalmente durante 6 días. A continuación, se evaluó la viabilidad celular utilizando lecturas alamarBlue[®]. En el caso de que se redujese la viabilidad celular a más de 50% del control, se calcularon los valores de IC₅₀ utilizando medias de cada concentración de anticuerpo por triplicado; en caso contrario, en el caso de que el % de inhibición de la viabilidad celular a la concentración máxima fuese inferior a 50%, no pudo calcularse IC₅₀ y estaría indicado que IC₅₀ [µg/ml]

fuese superior (>) a la concentración máxima. También se investigaron los anticuerpos anti-HER3 U1-59 indicados en la patente WO nº 2007/077028 y Ab nº 6 indicado en la patente WO nº 2008/100625.

anticuerpo	IC ₅₀ [µg/ml]
mAb205.10.1	8,0
mAb205.10.2	3,8
mAb205.10.3	6,8
U1-59	12,4
Antic. nº 6	[60 µg/ml]

- 5 En un experimento adicional, se investigó el anticuerpo anti-HER3 8B8.2D9 descrito en el documento nº WO 97/35885 y 1B4C3, descrito en el documento nº WO 2003/013602.

anticuerpo	IC ₅₀ [µg/ml]
8B8.2D9	> 100 µg/ml (inhibición de 29% a 100 µg/ml)
1B4C3	> 100 µg/ml (inhibición de 26 % a 100 µg/ml)

Ejemplo 5

- 10 ADCC *in vitro* en células tumorales KPL-4 por lisis especif. (%) 1 µg/ml
- Se recogieron las células diana KPL4 (ADCC), de carcinoma mamario, cultivadas en RPMI 1640 + L-alanil-L-glutamina 2 mM + FCS al 10%, con tripsina/EDTA (Gibco nº 25300-054) en fase de crecimiento exponencial. Tras una etapa de lavado y comprobación del número y viabilidad celulares, la alícuota necesaria se marcó durante 30 minutos a 37°C en el incubador celular con calceína (Invitrogen nº C3100MP; se resuspendió 1 vial en 50 µl de DMSO para 5 millones de células en 5 ml de medio). A continuación, las células se lavaron tres veces con medio AIM-V, se comprobó el número y viabilidad celulares y se ajustó el número celular a 0,3 millones/ml.
- 20 A continuación, se prepararon PBMC (células mononucleares de sangre periférica) como células efectoras mediante centrifugación en gradiente de densidad (Histopaque-1077, Sigma nº H8889) siguiendo el protocolo del fabricante (etapas de lavadas 1x a 400g y 2x a 350g 10 minutos cada una). Se comprobó el número y viabilidad celulares y se ajustó el número celular a 15 millones/ml.
- 25 Se sembraron 100 µl de células diana teñidas con calceína en placas de 96 pocillos de fondo redondo; 50 µl de anticuerpo afucosilado diluido (mAb205.10.1, mAb205.10.2 y mAb205.10.3, ver la preparación posteriormente), que se añadieron, y 50 de células efectoras/µl. En algunos experimentos, las células diana se mezclaron con líquido Redimune® NF (ZLB Behring) a una concentración de 10 mg/ml de Redimune.
- 30 A modo de controles se utilizó la lisis espontánea, determinada mediante cocultivo de células diana y efectoras sin anticuerpo y la lisis máxima se determinó mediante lisis de Triton X-100 al 1% de las células diana únicamente. La placa se incubó durante 4 horas a 37°C en un incubador celular humidificado.
- 35 Se evaluó la eliminación de las células diana mediante medición de la liberación del LDH (lactato deshidrogenasa) de células dañadas utilizando el kit de detección de citotoxicidad (kit de detección de LDH, Roche nº 1 644 793) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 100 µl de sobrenadante de cada pocillo con 100 µl de sustrato del kit en una placa de 96 pocillos de fondo plano transparente. Se determinaron los valores V_{max} de la reacción de color del sustrato en un lector de ELISA a 490 nm durante por lo menos 10 minutos. Se calculó el porcentaje de eliminación celular específica mediada por anticuerpos de la manera siguiente: ((A – SR)/(MR – SR)x100, en la que A es la media de V_{max} a una concentración específica de anticuerpo, SR es la media de V_{max} de la liberación espontánea y MR es la media de V_{max} de la liberación máxima.
- 40 Como lectura adicional, se evaluó la retención de calceína de células diana intactas mediante lisado de las células diana restantes en tampón borato (borato sódico 5 mM + Triton al 0,1%) y midiendo la fluorescencia de calceína en un lector de placas de fluorescencia. Los anticuerpos mAb205.10.1, mAb205.10.2 y mAb205.10.3 mostraron una ADCC [KPL-4] por 1 µg/ml de lisis específica de entre 40% y 60%.

- Se prepararon anticuerpos afucosilados (mAb205.10.1, mAb205.10.2 y mAb205.10.3) mediante cotransfección con cuatro plásmidos, dos para la expresión de anticuerpos, uno para la expresión de polipéptido de fusión GnTIII (un vector de expresión de GnT-III) y uno para la expresión de manosidasa II (un vector de expresión de manosidasa II del Golgi) a una proporción de 4:4:1:1, respectivamente en células HEK293 o CHO.
- 50 Por ejemplo, las secuencias de ADN de cadena pesada y de cadena ligera del anticuerpo completo se subclonaron en vectores de expresión de mamífero (uno para la cadena ligera y uno para la cadena pesada) bajo el control del promotor MPSV y cadena arriba de un sitio poliA sintético, portando cada vector una secuencia OriP del VEB. Se

5 produjeron anticuerpos mediante cotransfección de células HEK293-EBNA o células CHO con los vectores de expresión de cadenas pesada y ligera de anticuerpo utilizando un enfoque de transfección con fosfato de calcio. Se transfectoron células HEK293-EBNA de crecimiento exponencial mediante el método del fosfato de calcio. Para la producción del anticuerpo glucomanipulado, las células se cotransfectaron con cuatro plásmidos, dos para la expresión de anticuerpos, uno para la expresión de un polipéptido de fusión GnTIII (un vector de expresión GnT-III) y uno para la expresión de manosidasa II (un vector de expresión de manosidasa II del Golgi) a una proporción de 4:4:1:1, respectivamente. Se cultivaron las células como cultivos de monocapas adherentes en matraces T utilizando un medio de cultivo DMEM suplementado con FCS al 10%, y se transfectoron al encontrarse a un nivel de confluencia de entre 50% y 80%. Para la transfección de un matraz T150, se sembraron, por ejemplo, 15 millones de células 24 horas antes de la transfección en 25 ml de medio de cultivo DMEM complementado con FCS (al 10% v/v concentración final) y las células se introdujeron en un incubador a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ durante la noche. Para cada anticuerpo que debía producirse, se preparó una solución de ADN, CaCl₂ y agua mediante la mezcla de 188 mg de ADN de vector plásmido (cuatro plásmidos, dos para la expresión de anticuerpos (una cadena ligera y una cadena pesada), uno para la expresión de un polipéptido de expresión GnTIII (un vector de expresión de GnT-III) y uno para la expresión de manosidasa II (un vector de expresión de manosidasa II del Golgi) en una proporción de 4:4:1:1, respectivamente), agua a un volumen final de 938 ml y 938 ml de una solución 1 M de CaCl₂. A esta solución se añadieron 1.876 µl de una solución de HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM a pH 7,05, se mezcló inmediatamente durante 10 s y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 s. La suspensión se diluyó con 46 ml de DMEM suplementado con FCS al 2%, y se dividió en dos matraces T150 en lugar del medio existente.

25 Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante aproximadamente 17 a 20 horas, después se sustituyó el medio por 25 ml de DMEM, FCS al 10%. El medio de cultivo condicionado se recolectó 7 días después de la transfección mediante centrifugación durante 15 minutos a 210 x g, la solución se esterilizó mediante filtración (filtro de 0,22 µm) y se añadió azida sódica en una concentración final de 0,01% p/v, y se mantuvo a 4°C.

30 Los anticuerpos afucosilados secretados se purificaron y los oligosacáridos unidos a la región Fc de los anticuerpos se analizaron mediante, por ejemplo, EM MALDI/TOF (tal como se describe en, por ejemplo, el documento n° WO 2008/077546). Para este análisis, los oligosacáridos se liberaron enzimáticamente de los anticuerpos mediante digestión con PNGasaF, encontrándose los anticuerpos inmovilizados sobre una membrana de PVDF o en solución. La solución digerida resultante que contenía los oligosacáridos liberados se preparó directamente para el análisis de EM MALDI/TOF o se digirió adicionalmente con glucosidasa EndoH antes de la preparación de las muestras para el análisis de EM MALDI/TOF. La cantidad analizada de fucosa dentro de la cadena sacárida en Asn297 era de entre 50% y 20%.

35 Ejemplo 6

Eficacia antitumoral *in vivo*

40 Pudo detectarse la eficacia antitumoral *in vivo* de los anticuerpos mAb205.10.1, mAb205.10.2 y mAb205.10.3 en modelos basados en células y en fragmentos de diverso origen tumoral (por ejemplo cáncer pulmonar, CCCCE, cáncer mamario y pancreático) trasplantados en ratones SCID beige o desnudos. A título de ejemplos se muestran datos para el modelo de xenoinjerto de CCCCE FaDu (basado en la línea celular), modelo de cáncer de mama MAXF449 (basado en fragmentos) y CPCNP modelo 7177 (basado en fragmentos).

45 Agentes de ensayo

50 Se proporcionó el anticuerpo mAb205.10.2 afucosilado (denominado mAb 205 en las figuras 2, 3 y 4) en forma de solución madre de Roche, Penzberg, Alemania. El tampón para anticuerpos incluía histidina. La solución para anticuerpos se diluyó apropiadamente en tampón a partir de inyecciones anteriores de solución madre.

Líneas celulares y condiciones de cultivo

55 Las células FaDu de CCCCE humanas se obtuvieron originalmente de la ATCC. La línea celular tumoral se cultivó rutinariamente en medio MEM de Eagle complementado con suero de feto bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM y NEAA 0,1 mM a 37°C en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO₂. Se llevó a cabo pases de cultivo con subdivisiones en tripsina/EDTA 1x cada tres días.

60 Fragmentos de tumor

Se obtuvieron originalmente fragmentos de tumor de pacientes y se trasplantaron s.c. en ratones donantes desnudos. A continuación, los fragmentos de tumor se subcultivaron en serie *in vivo*. Para un estudio preclínico, se generaron fragmentos pequeños de tumor a partir de ratones donantes y se introdujeron s.c. en otros ratones desnudos (MAXF449, 7177).

65

Animales

5 Se obtuvieron ratones SCID beige o desnudos hembra del criador (por ejemplo Charles River, Sulzfeld, Alemania) y se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicas en ciclos diarios de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad según directrices comprometidas (GV-Solas, Felasa, TierschG). El protocolo del estudio experimental fue revisado y autorizado por el gobierno local. Tras la llegada, los animales se mantuvieron en la parte de cuarentena de las instalaciones para los animales durante una semana para que se aclimatasen al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento continuo de su salud de manera periódica. Se proporcionó alimentación dietética (Provimi Kliba 3337) y agua (acidificada a pH 2,5 a 3) *ad libitum*.

10 Seguimiento

15 Los animales se controlaron diariamente para síntomas clínicos y la detección de efectos adversos. Para el seguimiento durante el experimento, se documentó el peso corporal de los animales.

Tratamiento de los animales

20 El tratamiento de los animales se inició tras la aleatorización de los animales tras el trasplante de células o fragmentos cuando la mediana de tamaño tumoral era de entre aproximadamente 100 mm³ y 150 mm³. Se administró anticuerpo como único agente a una concentración de 10 ó 25 mg/kg i.p. q7d una vez a la semana durante 3 a 6 semanas, dependiendo del modelo. El vehículo correspondiente se administró los mismos días.

Eficacia de los anticuerpos

25 A) Xenoinjerto HNSCC FaDu

30 Se trataron ratones que portaban xenoinjerto FaDu de CCCCE con anticuerpo mAb205.10.2 entre los días de estudio 14 y 35. Como resultado, el tratamiento con el anticuerpo mAb205.10.2 mostró una eficacia antitumoral significativa con estabilización tumoral de xenoinjertos s.c. de FaDu. Se calculó una inhibición del crecimiento tumoral (TGI) de 98%.

El tratamiento con mAb 205 (10 mg/kg q7dx3, i.p.) resultó en la estabilización tumoral de xenoinjertos trasplantados FaDu de CCCCE (ver la figura 2).

35 B) Xenoinjerto de cáncer mamario MAXF449

40 Se trataron ratones que portaban xenoinjerto de cáncer mamario MAXF449 con anticuerpo mAb205.10.2 entre los días de estudio 64 y 91. Como resultado, el tratamiento con el anticuerpo mAb205.10.2 mostró una eficacia antitumoral significativa con estabilización tumoral de los xenoinjertos MAXF449. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) era superior al 100%.

El tratamiento con mAb 205 (10 mg/kg q7d, i.p.) resultó en la estabilización tumoral de xenoinjertos trasplantados de cáncer mamario MAXF449 (ver la figura 3).

45 Se trataron ratones que portaban xenoinjerto CCCCE 7177 con anticuerpo mAb 205.10.2 entre los días de estudio 28 y 56. Como resultado, el tratamiento con el anticuerpo mAb205.10.2 mostró una eficacia antitumoral significativa con estabilización tumoral de xenoinjertos de CCCCE 7177. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) era superior al 100%.

50 El tratamiento con mAb 205 (25 mg/kg q7d, i.p.) resultó en la estabilización tumoral de xenoinjertos trasplantados de CCCCE 7177 (ver la figura 4).

LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> Roche Glycart AG

<120> Anticuerpos anti-HER3 y usos de los mismos

60 <130> 26521 WO

<150> EP 09015831.2

<151> 2009-12-22

65 <160> 17

ES 2 571 226 T3

<170> PatentIn versión 3,5

<210> 1

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> CDR3H de cadena pesada, mAb 205.10

<400> 1

His Arg Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Leu Thr Tyr
1 5 10

15 <210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> CDR2Hde cadena pesada, mAb 205.10

<400> 2

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

25 **Gly**

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> CDR1H de cadena pesada, mAb 205.10

35 <400> 3

Gly Tyr Thr Phe Arg Ser Ser Tyr Ile Ser
1 5 10

<210> 4

40 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

45 <223> CDR3L de cadena ligera, mAb 205.10

<400> 4

Gln Ser Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

50 <210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

55 <220>

<223> CDR2L de cadena ligera, mAb 205.10

<400> 5

ES 2 571 226 T3

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

5 <210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> CDR1L de cadena ligera (variante 1), mAb 205.10

<400> 6

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

15 **Thr**
<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> CDR1 de cadena ligera (variante 2), mAb 205.10

<400> 7

25 **Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu**
1 5 10 15

Thr
<210> 8
<211> 120
30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> dominio variable de cadena pesada V_H, mAb 205.10

<400> 8

ES 2 571 226 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Ser Pro Ser Tyr Asn Gln Lys Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Arg Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Leu Thr Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> dominio variable de cadena ligera V_L, mAb 205.10.1

10

<400> 9

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ser
 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

ES 2 571 226 T3

<210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> dominio variable de cadena ligera VL, mAb 205.10.2

<400> 10

10

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser
          20           25           30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          35           40           45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ser
          85           90           95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110
    
```

Lys

<210> 11
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> dominio variable de cadena ligera VL, mAb 205.10.3

20

<400> 11

ES 2 571 226 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ser Ile Tyr Tyr Cys Gln Ser
 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 12

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

10 <210> 13
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 13

ES 2 571 226 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

ES 2 571 226 T3

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 14
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> región constante de cadena pesada humana derivada de IgG1 mutada en L234A y L235A

10

<400> 14

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

ES 2 571 226 T3

100	105	110
Pro Ala Pro 115	Glu Ala Ala Gly Gly 120	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 125
Lys Pro Lys 130	Asp Thr Leu Met Ile 135	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 140
Val Val Val 145	Asp Val Ser His Glu Asp 150	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 155 160
Tyr Val Asp 165	Gly Val Glu Val His Asn 170	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 175
Glu Gln Tyr 180	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val 185	Ser Val Leu Thr Val Leu 190
His Gln Asp 195	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr 200	Lys Cys Lys Val Ser Asn 205
Lys Ala Leu 210	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr 215	Ile Ser Lys Ala Lys Gly 220
Gln Pro Arg 225	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu 230	Pro Pro Ser Arg Asp Glu 235 240
Leu Thr Lys 245	Asn Gln Val Ser Leu Thr 250	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 255
Pro Ser Asp 260	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser 265	Asn Gly Gln Pro Glu Asn 270
Asn Tyr Lys 275	Thr Thr Pro Pro Val Leu 280	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 285
Leu Tyr Ser 290	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser 295	Arg Trp Gln Gln Gly Asn 300
Val Phe Ser 305	Cys Ser Val Met His Glu Ala 310	Leu His Asn His Tyr Thr 315 320
Gln Lys Ser 325	Leu Ser Pro Gly Lys 330	

<210> 15
 <211> 327
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

10

ES 2 571 226 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

ES 2 571 226 T3

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 16
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> región constante de cadena pesada humana derivada de IgG4 mutada en S228P

10

<400> 16

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

ES 2 571 226 T3

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 17
<211> 1342
5 <212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 17
Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu
1 5 10 15

Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr
20 25 30

ES 2 571 226 T3

Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr
 35 40 45
 Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu
 50 55 60
 Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile
 65 70 75 80
 Arg Glu Val Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Met Asn Glu Phe Ser Thr
 85 90 95
 Leu Pro Leu Pro Asn Leu Arg Val Val Arg Gly Thr Gln Val Tyr Asp
 100 105 110
 Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser
 115 120 125
 His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser
 130 135 140
 Gly Gly Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr
 145 150 155 160
 Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val
 165 170 175
 Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly
 180 185 190
 Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr
 195 200 205
 Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn
 210 215 220
 Gln Cys Cys His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp
 225 230 235 240
 Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val
 245 250 255
 Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu
 260 265 270
 Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala
 275 280 285
 Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala

ES 2 571 226 T3

290						295										300
Cys	Pro	Pro	Asp	Lys	Met	Glu	Val	Asp	Lys	Asn	Gly	Leu	Lys	Met	Cys	
305					310					315					320	
Glu	Pro	Cys	Gly	Gly	Leu	Cys	Pro	Lys	Ala	Cys	Glu	Gly	Thr	Gly	Ser	
				325					330					335		
Gly	Ser	Arg	Phe	Gln	Thr	Val	Asp	Ser	Ser	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	Val	
			340					345					350			
Asn	Cys	Thr	Lys	Ile	Leu	Gly	Asn	Leu	Asp	Phe	Leu	Ile	Thr	Gly	Leu	
		355					360						365			
Asn	Gly	Asp	Pro	Trp	His	Lys	Ile	Pro	Ala	Leu	Asp	Pro	Glu	Lys	Leu	
	370					375						380				
Asn	Val	Phe	Arg	Thr	Val	Arg	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Asn	Ile	Gln	
385					390					395					400	
Ser	Trp	Pro	Pro	His	Met	His	Asn	Phe	Ser	Val	Phe	Ser	Asn	Leu	Thr	
				405					410					415		
Thr	Ile	Gly	Gly	Arg	Ser	Leu	Tyr	Asn	Arg	Gly	Phe	Ser	Leu	Leu	Ile	
			420					425					430			
Met	Lys	Asn	Leu	Asn	Val	Thr	Ser	Leu	Gly	Phe	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	
		435					440					445				
Ile	Ser	Ala	Gly	Arg	Ile	Tyr	Ile	Ser	Ala	Asn	Arg	Gln	Leu	Cys	Tyr	
	450					455					460					
His	His	Ser	Leu	Asn	Trp	Thr	Lys	Val	Leu	Arg	Gly	Pro	Thr	Glu	Glu	
465					470					475					480	
Arg	Leu	Asp	Ile	Lys	His	Asn	Arg	Pro	Arg	Arg	Asp	Cys	Val	Ala	Glu	
				485					490					495		
Gly	Lys	Val	Cys	Asp	Pro	Leu	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	
			500					505					510			
Gly	Pro	Gly	Gln	Cys	Leu	Ser	Cys	Arg	Asn	Tyr	Ser	Arg	Gly	Gly	Val	
		515					520					525				
Cys	Val	Thr	His	Cys	Asn	Phe	Leu	Asn	Gly	Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Ala	
	530					535					540					
His	Glu	Ala	Glu	Cys	Phe	Ser	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Met	Glu	
545					550					555					560	

ES 2 571 226 T3

Gly Thr Ala Thr Cys Asn Gly Ser Gly Ser Asp Thr Cys Ala Gln Cys
565 570 575

Ala His Phe Arg Asp Gly Pro His Cys Val Ser Ser Cys Pro His Gly
580 585 590

Val Leu Gly Ala Lys Gly Pro Ile Tyr Lys Tyr Pro Asp Val Gln Asn
595 600 605

Glu Cys Arg Pro Cys His Glu Asn Cys Thr Gln Gly Cys Lys Gly Pro
610 615 620

Glu Leu Gln Asp Cys Leu Gly Gln Thr Leu Val Leu Ile Gly Lys Thr
625 630 635 640

His Leu Thr Met Ala Leu Thr Val Ile Ala Gly Leu Val Val Ile Phe
645 650 655

Met Met Leu Gly Gly Thr Phe Leu Tyr Trp Arg Gly Arg Arg Ile Gln
660 665 670

Asn Lys Arg Ala Met Arg Arg Tyr Leu Glu Arg Gly Glu Ser Ile Glu
675 680 685

Pro Leu Asp Pro Ser Glu Lys Ala Asn Lys Val Leu Ala Arg Ile Phe
690 695 700

Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Leu Lys Val Leu Gly Ser Gly Val Phe
705 710 715 720

Gly Thr Val His Lys Gly Val Trp Ile Pro Glu Gly Glu Ser Ile Lys
725 730 735

Ile Pro Val Cys Ile Lys Val Ile Glu Asp Lys Ser Gly Arg Gln Ser
740 745 750

Phe Gln Ala Val Thr Asp His Met Leu Ala Ile Gly Ser Leu Asp His
755 760 765

Ala His Ile Val Arg Leu Leu Gly Leu Cys Pro Gly Ser Ser Leu Gln
770 775 780

Leu Val Thr Gln Tyr Leu Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp His Val Arg
785 790 795 800

Gln His Arg Gly Ala Leu Gly Pro Gln Leu Leu Leu Asn Trp Gly Val
805 810 815

ES 2 571 226 T3

Gln Ile Ala Lys Gly Met Tyr Tyr Leu Glu Glu His Gly Met Val His
820 825 830

Arg Asn Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Lys Ser Pro Ser Gln Val
835 840 845

Gln Val Ala Asp Phe Gly Val Ala Asp Leu Leu Pro Pro Asp Asp Lys
850 855 860

Gln Leu Leu Tyr Ser Glu Ala Lys Thr Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu
865 870 875 880

Glu Ser Ile His Phe Gly Lys Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser
885 890 895

Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Glu Pro Tyr
900 905 910

Ala Gly Leu Arg Leu Ala Glu Val Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu
915 920 925

Arg Leu Ala Gln Pro Gln Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val Met
930 935 940

Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Glu Asn Ile Arg Pro Thr Phe Lys Glu
945 950 955 960

Leu Ala Asn Glu Phe Thr Arg Met Ala Arg Asp Pro Pro Arg Tyr Leu
965 970 975

Val Ile Lys Arg Glu Ser Gly Pro Gly Ile Ala Pro Gly Pro Glu Pro
980 985 990

His Gly Leu Thr Asn Lys Lys Leu Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro Glu
995 1000 1005

Leu Asp Leu Asp Leu Asp Leu Glu Ala Glu Glu Asp Asn Leu Ala
1010 1015 1020

Thr Thr Thr Leu Gly Ser Ala Leu Ser Leu Pro Val Gly Thr Leu
1025 1030 1035

Asn Arg Pro Arg Gly Ser Gln Ser Leu Leu Ser Pro Ser Ser Gly
1040 1045 1050

Tyr Met Pro Met Asn Gln Gly Asn Leu Gly Glu Ser Cys Gln Glu
1055 1060 1065

ES 2 571 226 T3

Ser Ala Val Ser Gly Ser Ser Glu Arg Cys Pro Arg Pro Val Ser
1070 1075 1080

Leu His Pro Met Pro Arg Gly Cys Leu Ala Ser Glu Ser Ser Glu
1085 1090 1095

Gly His Val Thr Gly Ser Glu Ala Glu Leu Gln Glu Lys Val Ser
1100 1105 1110

Met Cys Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Pro Arg Pro Arg Gly
1115 1120 1125

Asp Ser Ala Tyr His Ser Gln Arg His Ser Leu Leu Thr Pro Val
1130 1135 1140

Thr Pro Leu Ser Pro Pro Gly Leu Glu Glu Glu Asp Val Asn Gly
1145 1150 1155

Tyr Val Met Pro Asp Thr His Leu Lys Gly Thr Pro Ser Ser Arg
1160 1165 1170

Glu Gly Thr Leu Ser Ser Val Gly Leu Ser Ser Val Leu Gly Thr
1175 1180 1185

Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Tyr Met Asn Arg Arg
1190 1195 1200

Arg Arg His Ser Pro Pro His Pro Pro Arg Pro Ser Ser Leu Glu
1205 1210 1215

Glu Leu Gly Tyr Glu Tyr Met Asp Val Gly Ser Asp Leu Ser Ala
1220 1225 1230

Ser Leu Gly Ser Thr Gln Ser Cys Pro Leu His Pro Val Pro Ile
1235 1240 1245

Met Pro Thr Ala Gly Thr Thr Pro Asp Glu Asp Tyr Glu Tyr Met
1250 1255 1260

Asn Arg Gln Arg Asp Gly Gly Gly Pro Gly Gly Asp Tyr Ala Ala
1265 1270 1275

Met Gly Ala Cys Pro Ala Ser Glu Gln Gly Tyr Glu Glu Met Arg
1280 1285 1290

Ala Phe Gln Gly Pro Gly His Gln Ala Pro His Val His Tyr Ala
1295 1300 1305

Arg Leu Lys Thr Leu Arg Ser Leu Glu Ala Thr Asp Ser Ala Phe

ES 2 571 226 T3

1310

1315

1320

Asp Asn Pro Asp Tyr Trp His Ser Arg Leu Phe Pro Lys Ala Asn
1325 1330 1335

Ala Gln Arg Thr
1340

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que es ligante de HER3 humano, caracterizado por que:
 - 5 el dominio variable de cadena pesada V_H es la SEC ID nº 8, y el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID nº 9, o el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID nº 10, o el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID nº 11.
- 10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado por que:
 - el dominio variable de cadena pesada V_H es la SEC ID nº 8, y el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID nº 9, o
 - el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID nº 11.
- 15 3. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado por que:
 - el dominio variable de cadena pesada V_H es la SEC ID nº 8, y el dominio variable de cadena ligera V_L es la SEC ID nº 10.
- 20 4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el anticuerpo es monoclonal.
- 25 5. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el anticuerpo es de la subclase IgG1.
6. Anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dicho anticuerpo se encuentra glucosilado con una cadena sacárida en Asn297, en la que la proporción de fucosa en dicha cadena sacárida es 65% o inferior.
- 30 7. Anticuerpo según la reivindicación 6, en el que la cantidad de fucosa en dicha cadena sacárida es de entre 5% y 65%.
8. Composición farmacéutica caracterizada por que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 35 9. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la utilización en el tratamiento del cáncer.
10. Utilización de un anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 7 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.
- 40 11. Ácido nucleico codificante de una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo ligante de HER3 humano, caracterizado por que dicho anticuerpo comprende un dominio variable V_H de SEC ID nº 8 y un dominio variable de cadena ligera V_L de SEC ID nº 9, SEC ID nº 10 o SEC ID nº 11.
- 45 12. Vector de expresión caracterizado por que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 11, para la expresión del anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 7 en una célula huésped procariótica o eucariótica.
13. Célula huésped procariótica o eucariótica que comprende un vector según la reivindicación 12.
- 50 14. Método para la producción de un anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que se expresa un ácido nucleico según la reivindicación 11 en una célula huésped procariótica o eucariótica, y se recupera dicho anticuerpo a partir de dicha célula o del sobrenadante de cultivo celular.

Fig. 1A

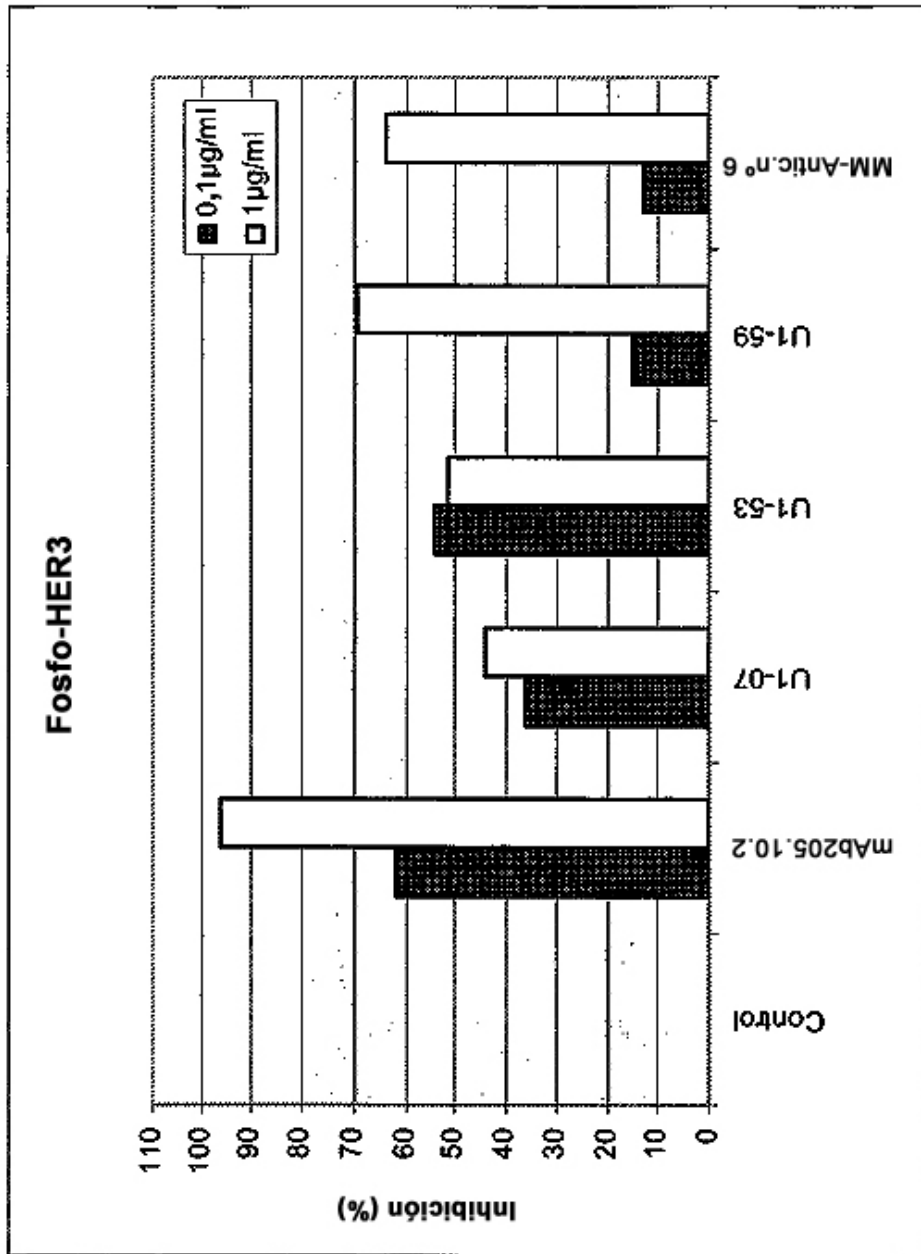


Fig. 1B

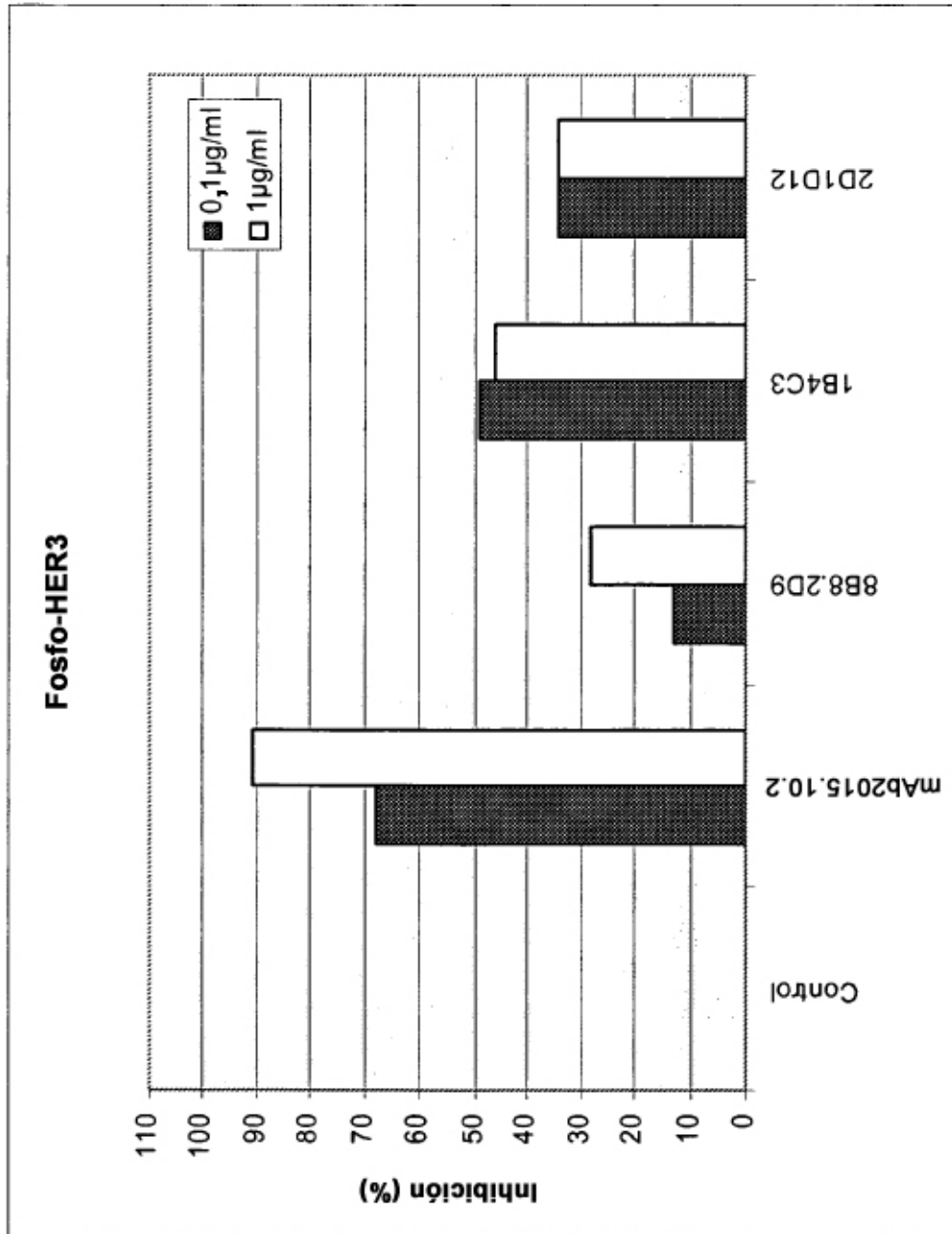


Fig. 1C

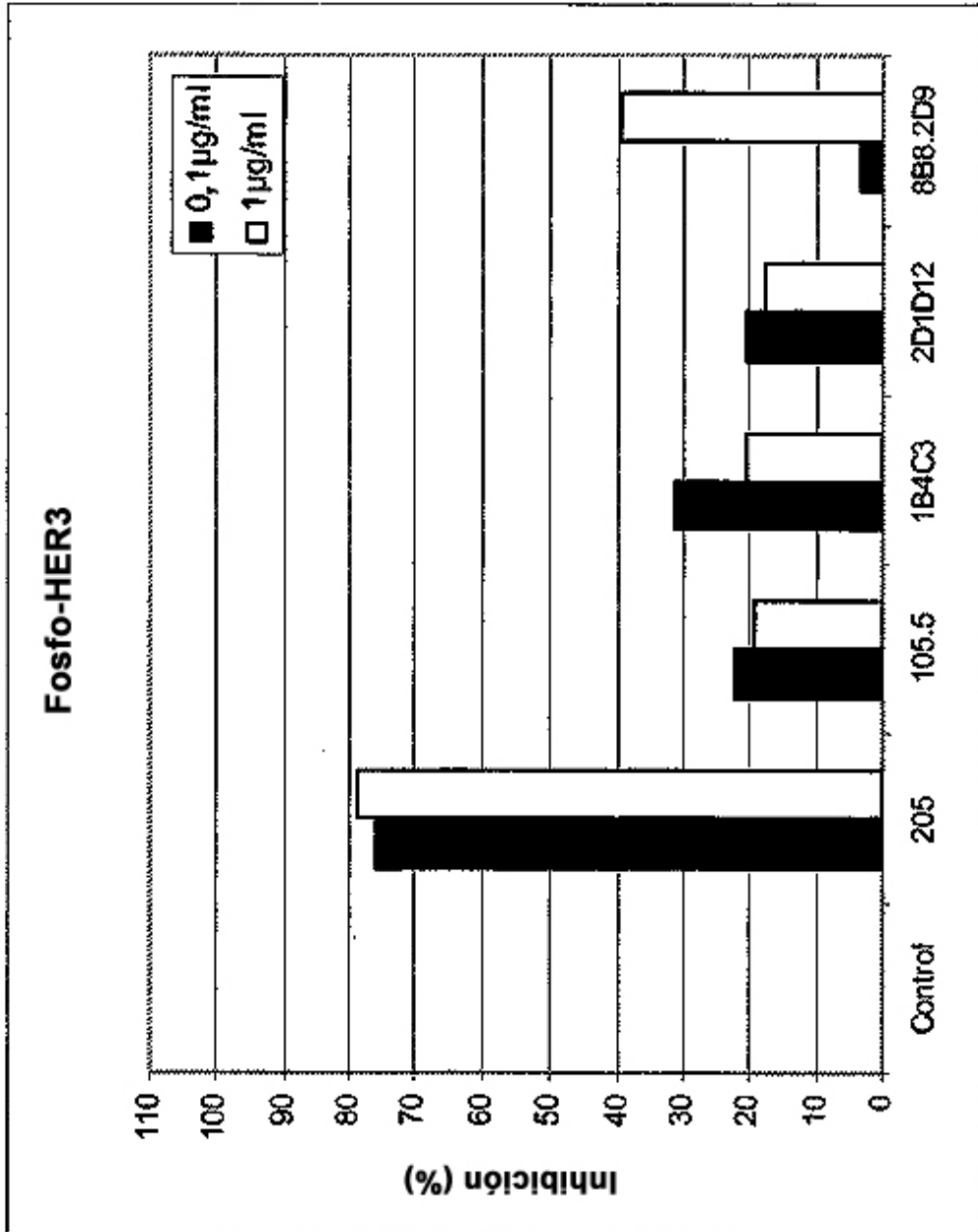


Fig. 2

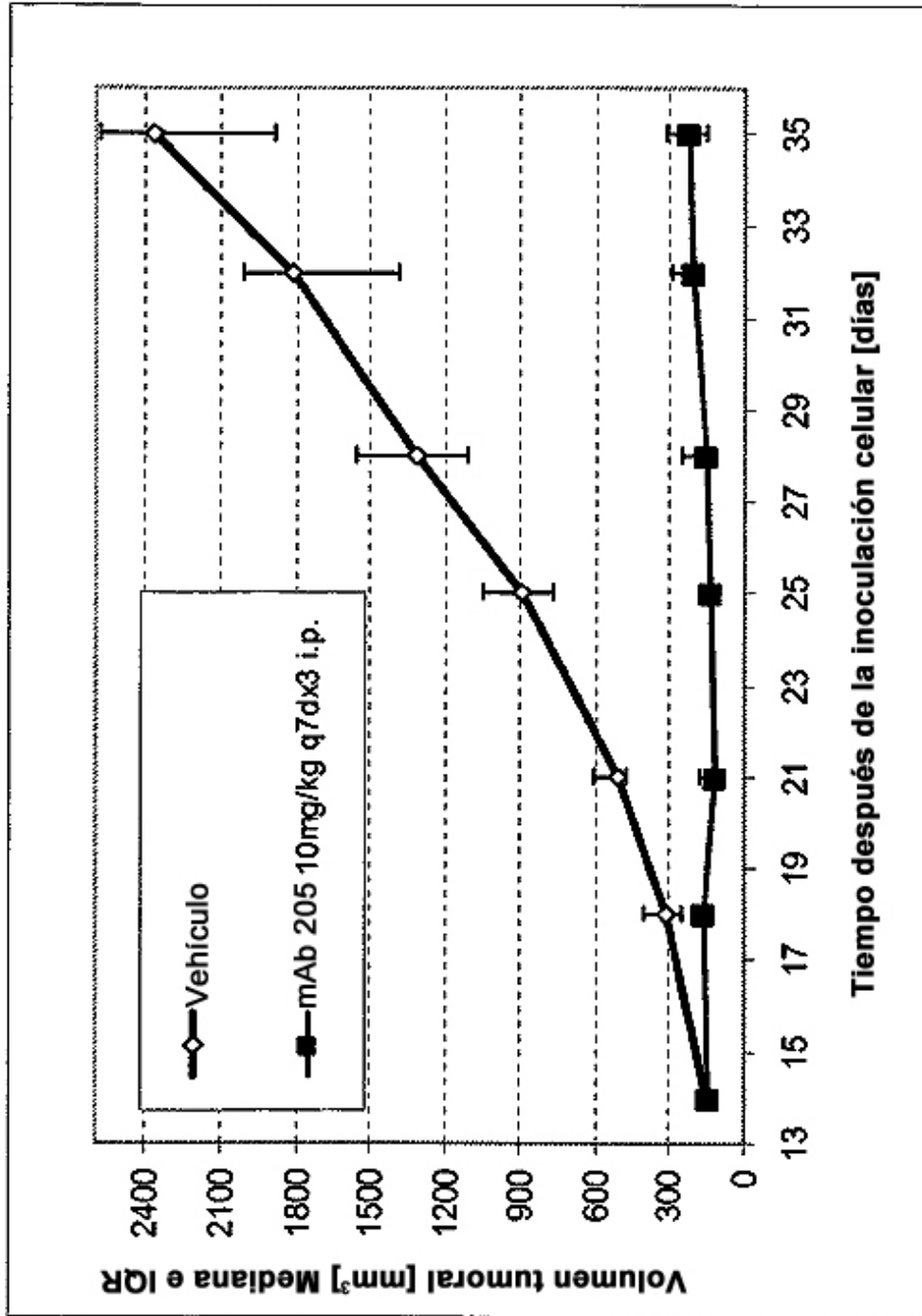


Fig. 3

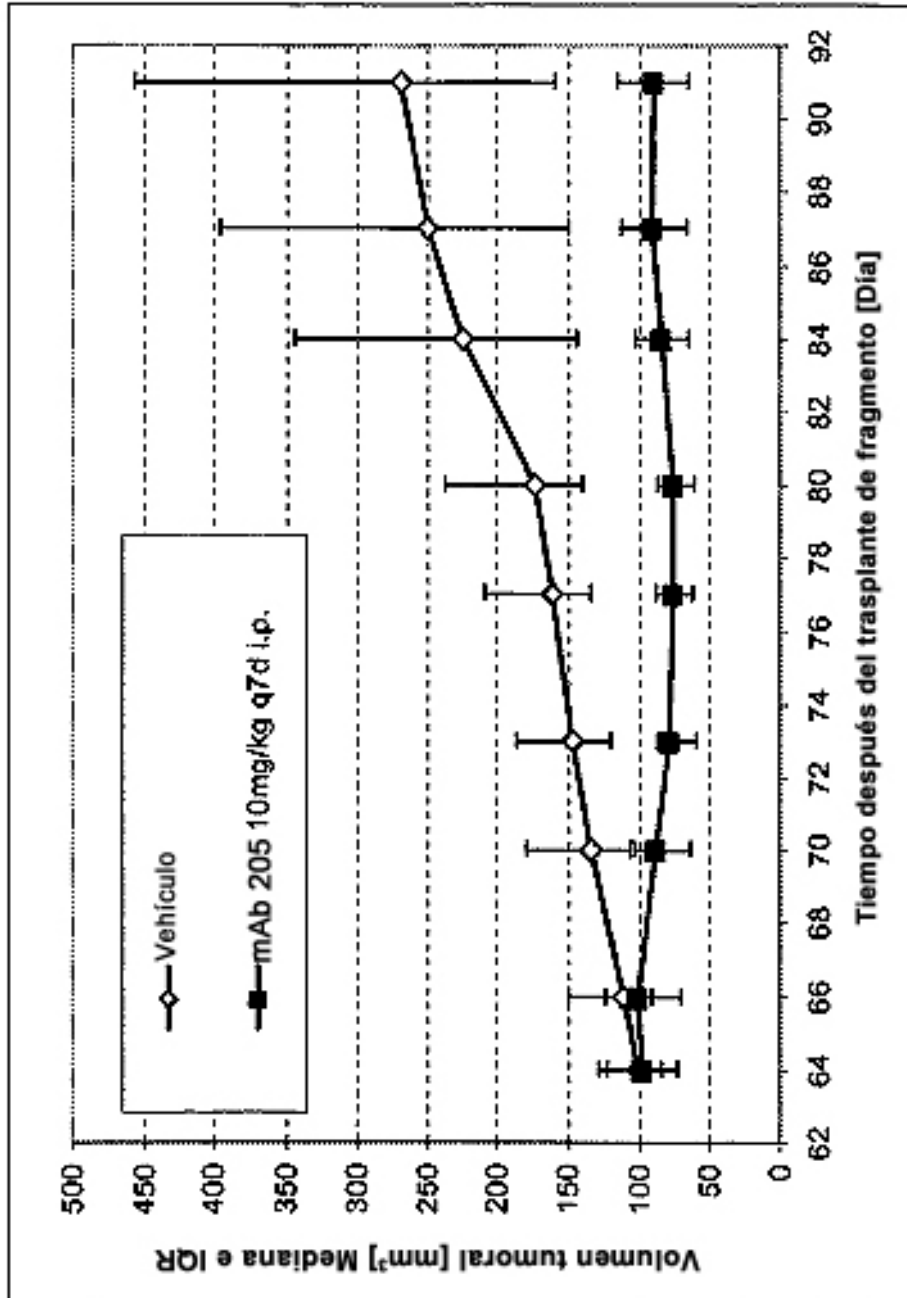


Fig. 4

