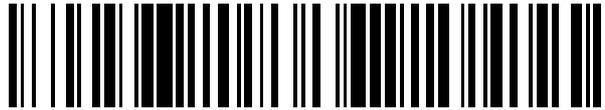


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 728**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2010 E 10710142 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2408817**

54 Título: **Anticuerpos anti-HER biespecíficos**

30 Prioridad:

20.03.2009 US 210562 P

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

02.06.2016

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**FUH, GERMAINE;
SCHAEFER, GABRIELE;
HABER, LAURIC y
SLIWKOWSKI, MARK X.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 572 728 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-HER biespecíficos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-HER, incluyendo anticuerpos anti-HER multiespecíficos con especificidad de unión para al menos dos receptores HER diferentes, y el uso de los anticuerpos para tratar enfermedades o trastornos.

10

Antecedentes de la invención

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

15

El EGFR, codificado por el gen *erbB1*, se ha implicado de forma causal en las malignidades humanas. En particular, la expresión aumentada del EGFR se ha observado en el cáncer de mama, de vejiga, de pulmón, de cabeza, de cuello y de estómago así como en los glioblastomas. La expresión aumentada del receptor EGFR se asocia normalmente a la producción aumentada del ligando del EGFR, el factor transformante del crecimiento alfa (TGF- α), por las mismas células tumorales que da como resultado la activación del receptor por una ruta estimuladora autocrina. Baselga y Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR o sus ligandos, TGF- α y EGF, se han evaluado como agentes terapéuticos en el tratamiento de tales malignidades. Véase, por ejemplo, Baselga y Mendelson., arriba; Masui et al. *Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); y Wu et al. *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995).

20

25

El segundo miembro de la familia HER, HER2 (p185^{neu}), se identificó originalmente como el producto del gen transformante de los neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. La forma activada del proto-oncogén *neu* resulta de una mutación puntual (valina a ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de *neu* se observa en los cánceres de mama y de ovario y se correlaciona con un mal pronóstico (Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989); y Patente de EE.UU. N.º 4.968.603). La sobreexpresión de HER2 (frecuentemente pero no uniformemente debido a la amplificación génica) también se ha observado en otros carcinomas incluyendo carcinomas del estómago, del endometrio, de la glándula salivar, del pulmón, del riñón, del colon, de tiroides, del páncreas y de la vejiga. Véase, entre otros, King et al., *Science*, 229:974 (1985); Yokota et al., *Lancet*: 1:765-767 (1986); Fukushige et al., *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Guerin et al., *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen et al., *Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura et al., *Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst et al., *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner et al., *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern et al., *Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park et al., *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau et al., *Mol. Carcinog.*, 3:254-257 (1990); Aasland et al. *Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988); Williams et al. *Pathobiology* 59:46-52 (1991); y McCann et al., *Cancer*, 65:88-92 (1990). HER2 puede sobreexpresarse en el cáncer de próstata (Gu et al. *Cancer Lett.* 99:185-9 (1996); Ross et al. *Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997); Ross et al. *Cancer* 79:2162-70 (1997); y Sadasivan et al. *J. Urol.* 150:126-31 (1993)).

30

35

40

Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos proteicos de rata p185^{neu} y de humano HER2. Drebin y sus colaboradores han planteado anticuerpos contra el producto génico *neu* de rata, p185^{neu}. Véase, por ejemplo, Drebin et al., *Cell* 41:695-706 (1985); Myers et al., *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); y el documento wO94/22478 Drebin et al. *Oncogene* 2:273-277 (1988) informa que las mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones distintas de p185^{neu} dan como resultado efectos anti-tumorales sinérgicos en células NIH-3T3 transformadas con *neu* implantadas en ratones desnudos. Véase también la Patente de EE.UU. n.º 5.824.311 enviada el 20 de octubre, 1998.

45

50

Hudziak et al., *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989) describe la generación de un panel de anticuerpos HER2 que se caracterizaron usando la línea celular SK-BR-3 de tumor de mama humano. La proliferación celular relativa de las células SK-BR-3 después de la exposición a los anticuerpos se determinó por tinción de cristal violeta de las monocapas después de 72 horas. Usando este ensayo, se obtuvo la inhibición máxima con el anticuerpo denominado 4D5 que inhibió la proliferación celular un 56 %. Otros anticuerpos en el panel redujeron la proliferación celular en un menor grado en este ensayo. Se descubrió adicionalmente que el anticuerpo 4D5 sensibiliza las líneas celulares de tumor de mama que sobreexpresan HER2 a los efectos citotóxicos del TNF- α . Véase también la Patente de EE.UU. N.º 5.677.171, enviada el 14 de octubre, 1997. Los anticuerpos HER2 analizados en Hudziak et al. se caracterizan adicionalmente en Fendly et al. *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts et al. *In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarup et al. *Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard et al. *J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991); Kumar et al. *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991); Lewis et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras et al. *Oncogene* 9:1829-1838 (1994); Vitetta et al. *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski et al. *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994); Scott et al. *J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); D'souza et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994); Lewis et al. *Cancer Research* 56:1457-1465 (1996); y Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997).

55

60

65

Una versión humanizada recombinante del anticuerpo 4D5 murino HER" (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumab o HERCEPTIN®; Patente de EE.UU. N.º 5.821.337) es clínicamente activa en pacientes en cánceres de mama metastásicos que sobreexpresan HER2 que han recibido terapia anti-cáncer anterior extensiva (Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14:737-744 (1996)). El trastuzumab recibió la aprobación de comercialización desde la Food and Drug Administration el 25 de septiembre, 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2.

Se han descrito otros anticuerpos HER2 con diversas propiedades en Tagliabue et al. Int. J. Cancer 47:933-937 (1991); McKenzie et al. Oncogene 4:543-548 (1989); Maier et al. Cancer Res. 51:5361-5369 (1991); Bacus et al. Molecular Carcinogenesis 3:350-362 (1990); Stancovski et al. PNAS (EE.UU.) 88:8691-8695 (1991); Bacus et al. Cancer Research 52:2580-2589 (1992); Xu et al. Int. J. Cancer 53:401-408 (1993); documento WO94/00136; Kasprzyk et al. Cancer Research 52:2771-2776 (1992); Hancock et al. Cancer Res. 51:4575-4580 (1991); Shawver et al. Cancer Res. 54:1367-1373 (1994); Arteaga et al. Cancer Res. 54:3758-3765 (1994); Harwerth et al. J. Biol. Chem. 267:15160-15167 (1992); Patente de EE.UU. N.º 5.783.186; y Klapper et al. Oncogene 14:2099-2109 (1997).

La exploración de homología dio como resultado la identificación de otros dos miembros de la familia de receptores HER; HER3 (Patentes de EE.UU. N.º 5.968.511, N.º 5.183.884 y N.º 5.480.968 así como Kraus et al. PNAS (EE.UU.) 86:9193-9197 (1989)) y HER4 (Solicitud de Patente EP N.º 599.274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90:1746-1750 (1993); y Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993)). Ambos de estos receptores muestran expresión aumentada en al menos algunas líneas celulares de cáncer de mama.

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

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

Los productos terapéuticos que marcan como diana la ruta HER están actualmente en uso para tratar enfermedades tales como cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer colorectal, cáncer de cabeza y cuello y cáncer pancreático. Aunque estos productos terapéuticos han tenido algo de éxito, se mantienen problemas relacionados con la resistencia nativa e inducida y la toxicidad. Arteaga CL. J Clin Oncol 21:289-91s (2003); Hoshi S, et al., Gan To Kagaku Ryoho 31:1209-13 (2004); Vilorio-Petit AM, y Kerbel RS. Int J Radiat Oncol Biol Phys 58:914-26 (2004); Bianco R. et al., Endocr Relat Cancer 12:S159-71 (2005); Engelman JA, y Janne PA., Clin Cancer Res 14:2895-9 (2008); Davoli A, et al., Cancer Chemother Pharmacol. 65(4):611-23 (2010); Pohlmann PR, et al., Clin Cancer Res. 15(24):7479-7491 (2009). En particular, los productos terapéuticos que marcan como diana HER1 (EGFR) se asocian normalmente a efectos laterales indeseados, tales como niveles significativos de toxicidad en la piel. Robert, et al. Lancet Oncology 6:491-500 (2005).

En consecuencia, existe una necesidad de desarrollar productos terapéuticos mejorados que marquen como diana la ruta de HER.

Sumario de la invención

- 5 La invención proporciona anticuerpos multiespecíficos que comprenden un dominio de unión a antígenos que se une específicamente a dos receptores HER EGFR y HER3 como se define en las reivindicaciones. El anticuerpo inhibe una actividad biológica de al menos uno de los receptores HER. En realizaciones particulares, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a sus receptores HER diana y no se une específicamente a los receptores HER no diana. En consecuencia, en una realización, el anticuerpo se une específicamente al EGFR y al HER3 pero no se une específicamente a HER2 o a HER4.
- 10 Un aspecto de la invención proporciona anticuerpos multiespecíficos que son capaces de unirse específicamente al receptor EGFR y al HER3 que son menos tóxicos que los antagonistas tradicionales del EGFR, tales como cetuximab, donde la toxicidad es toxicidad dermatológica.
- 15 El anticuerpo multiespecífico inhibe una actividad biológica de al menos uno del EGFR y el HER3, inhibe la unión del EGF al EGFR, inhibe la fosforilación del EGFR inducida por TGF- α , inhibe el crecimiento de células tumorales y se une específicamente al EGFR y al HER3 pero no se une específicamente al HER2 o al HER4.
- 20 El anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 con una Kd de menos de 10^{-6} M, en particular con una Kd de menos de 10^{-6} M y específicamente se une al HER3 con una Kd de menos de 10^{-7} M.
- 25 El anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de LSGDWIH (SEQ ID NO: 48); (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VGEISAAGGYTD (SEQ ID NO: 51); y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARESRVSFEEAMDY (SEQ ID NO: 53); y (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de NIATDVA (SEQ ID NO: 55); (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASF (SEQ ID NO: 56); y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEPEPYT (SEQ ID NO: 57).
- 30 En una realización, el anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 comprende (a) un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; (b) un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; o (c) una secuencia de dominio variable de cadena pesada como en (a) y una secuencia de dominio variable de cadena ligera como en (b). En una realización, el anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 30. En una realización, el anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 comprende un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 29. En otra realización, el anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 30 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 29.
- 40 En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 es el anticuerpo IgG1 de longitud completa.
- 45 Un aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica los anticuerpos HER multiespecíficos. Otro aspecto proporciona una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico que codifica los anticuerpos HER multiespecíficos. Todavía otro aspecto proporciona un método para producir un anticuerpo HER multiespecífico que comprende cultivar la célula hospedadora que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo HER multiespecífico de tal manera que se produzca el anticuerpo.
- 50 Un aspecto de la invención proporciona un inmunocombinado que comprende el anticuerpo HER multiespecífico y un agente citotóxico. Otro aspecto proporciona una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo HER multiespecífico y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un aspecto de la invención proporciona el anticuerpo multiespecífico para su uso en un método de tratar un individuo que tiene cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo HER multiespecífico. En una realización, el cáncer tratado por el anticuerpo HER multiespecífico comprende células que expresan el EGFR y el HER3. En una realización, el cáncer tratado por el anticuerpo HER multiespecífico es cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer de próstata o cáncer de pulmón no microcítico.
- 60 Otro aspecto de la invención proporciona el anticuerpo multiespecífico para su uso en un método de inhibir una actividad biológica de un receptor HER en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo HER multiespecífico.
- 65 Un aspecto de la invención proporciona el anticuerpo HER multiespecífico para su uso como un medicamento. Otro aspecto proporciona el anticuerpo HER multiespecífico para su uso tratando el cáncer, tal como cáncer de mama,

cáncer colorectal, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata o cáncer de pulmón no microcítico. Otro aspecto proporciona el anticuerpo HER multiespecífico para su uso inhibiendo una actividad biológica de un receptor HER.

5 Otro aspecto de la invención proporciona el anticuerpo HER multiespecífico para su uso en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede usarse, en una realización, para tratar el cáncer, tal como cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata o cáncer de pulmón no microcítico. En una realización, el medicamento es para inhibir una actividad biológica de un receptor HER.

10

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la inhibición del crecimiento tumoral por el anticuerpo D1.5 anti-EGFR en un modelo de xenoinjerto A431.

15

La Figura 2 muestra la especificidad de unión de clones con especificidad dual.

La Figura 3 muestra la inhibición de la fosforilación del EGFR inducida por TGF- α usando anticuerpos seleccionados que tienen especificidad dual (anticuerpos anti-EGFR/HER3 y anti-EGFR/HER2).

20

La Figura 4 muestra que los anticuerpos anti-EGFR/HER3 bloquean la unión de la herregulina al HER3-ECD-Fc.

La Figura 5 muestra la inhibición de la fosforilación del receptor inducida por HRG en células MCF7 por anticuerpos anti-EGFR/HER3 biespecíficos.

25

La Figura 6 muestra la inhibición de la proliferación celular de las células MDA-175 por anticuerpos anti-EGFR/HER3.

30

La Figura 7 es una imagen que muestra los puntos calientes de D1.5-100 mapeados en la estructura 4D5-Fv.

35

La Figura 8 indica una estrategia para la maduración de la afinidad del anticuerpo D1.5-100 EGFR-HER3 usando bibliotecas de shotgun.

La Figura 9 muestra que dos anticuerpos de afinidad maduros seleccionados (DL7 y DL11) son específicos tanto para EGFR como para HER3.

40

La Figura 10: A) Muestra la comparación de la función inhibidora de los anticuerpos maduros DL7 y DL11 y el anticuerpo parental D1.5 en el EGFR. B) Muestra la comparación de la función inhibidora de los anticuerpos de afinidad maduros DL7 y DL11 y del anticuerpo DL3.6 monoespecífico anti-HER3 en la transactivación de HER3.

45

La Figura 11 A) Proporciona gráficos que muestran la comparación de la función inhibidora del crecimiento de DL11 en comparación con pertuzumab, un anticuerpo anti-EGFR, y un anticuerpo anti-HER3, o DL3.6, D1.5, o la combinación de D1.5 más DL3.6 en las células H1666, una línea celular de NSCLC que expresa HER2, HER3, EGFR y ligandos de EGFR, crecimiento estimulado con HGR. B) Proporciona gráficos que muestran la comparación de la función inhibidora del crecimiento de DL11 en comparación con pertuzumab, un anticuerpo anti-EGFR y un anticuerpo anti-HER3, o DL3.6, D1.5, o la combinación de D1.5 más DL3.6 en una línea celular HSCLC H1666, crecimiento estimulado con TGF α .

50

La Figura 12 A) Proporciona gráficos que muestran la inhibición de la proliferación de células HCA-7, una línea celular de cáncer colorectal que expresa HER2, HER3 y EGFR por DL11 en comparación con pMab, un anticuerpo anti-EGFR y un anticuerpo anti-HER3. El crecimiento celular se estimuló con HRG. B) Proporciona gráficos que muestran la inhibición de la proliferación de células HCA-7 como en la Figura 12A excepto que el crecimiento celular se estimuló con HRG más TGF α .

55

La Figura 13 muestra la inhibición de la proliferación de células Calu-3, una línea de NSCLC que sobreexpresa HER2 y tiene niveles normales de HER3 y EGFR. El crecimiento celular se estimuló con HRG y los anticuerpos se ensayaron de forma dependiente de la dosis.

La Figura 14 indica una estrategia de clasificación para la maduración de la afinidad de D1.5-201.

60

La Figura 15 muestra la inhibición de la proliferación celular de MDA-175 por DL11, DL11b y DL11f.

La Figura 16 muestra que el DL11f inhibe la fosforilación de HER3 inducida por herregulina y la fosforilación de EGFR inducida por TGF α .

65

La Figura 17 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de trasplante de tumor HCA-7 por DL11 y DL11f.

5 La Figura 18 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto H358 NSCLC por DL11f.

La Figura 19 muestra la inhibición de la fosforilación de HER3 inducida por HRG por DL3-11b, DL3.6b y DL3.6.

10 Figura 20: Inhibición de la proliferación de células MDA-175 por DL3-11b, DL3.6b y DL3.6.

La Figura 21 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer FaDu por DL11f.

15 La Figura 22 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer pancreático BxPC3 por DL11f.

La Figura 23 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de pulmón no microcítico Calu-3 por DL11f.

20 La Figura 24 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer epidérmico A431 por DL11f.

25 La Figura 25 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de mama MAXF44 por DL11f.

La Figura 26 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de próstata DU145 por DL11f.

30 La Figura 27 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de ovario OVXF550 por DL11f.

La Figura 28 muestra que el DL11f induce ADCC en varias líneas celulares.

35 La Figura 29 muestra que DL11f N297A carece de actividad ADCC.

La Figura 30 muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer NSCLC H292 por DL11f y DL11f-N297A.

40 La Figura 31A-C es una tabla que proporciona información de toxicidades no clínicas y clínicas observadas para las terapias antagonistas de EGRF.

La Figura 32 es una tabla que proporciona información de la clasificación del sarpullido/descamación y el acné/sarpullido acneiforme.

45 La Figura 33 proporciona un alineamiento de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y del dominio variable de cadena ligera de varios anticuerpos anti-HER con numeración Kabat. La Figura 33A muestra el dominio variable de la cadena ligera de los siguientes anticuerpos: D1 (SEQ ID NO: 58); D1.5 (SEQ ID NO: 24); D1.5-100 (SEQ ID NO: 40); DL11 (SEQ ID NO: 27); DL11b (SEQ ID NO: 29); DL11f (SEQ ID NO: 29). La Figura 33B muestra el dominio variable de cadena pesada de los siguientes anticuerpos: D1 (SEQ ID NO: 25); D1.5 (SEQ ID NO: 25); D1.5-100 (SEQ ID NO: 25); DL11 (SEQ ID NO: 28); DL11b (SEQ ID NO: 28); DL11f (SEQ ID NO: 30).

Descripción detallada de la invención

55 I. Definiciones

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos de la técnica, las observaciones y otra terminología científica usada en el presente documento están destinados a tener los significados comúnmente entendidos por aquellos expertos en la materia a los que pertenece la presente invención. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento para claridad y/o por referencia fácil y la inclusión de tales definiciones en el presente documento no debe construirse necesariamente para representar una diferencia sustancial sobre lo que se entiende generalmente en la técnica. Las técnicas y los procedimientos descritos o que se hace referencia en el presente documento generalmente se entienden bien y se emplean comúnmente usando metodología convencional por aquellos expertos en la materia, tales como, por ejemplo, las metodologías de clonación molecular ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2a Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Según sea apropiado, los

procedimientos que implican el uso de kits y reactivos disponibles en el mercado se llevan a cabo generalmente de acuerdo con protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante salvo que se observe de otra manera.

Antes de que se describan los presentes métodos, kits y usos de los mismos, ha de entenderse que la presente invención no se limita a la metodología, los protocolos, las líneas celulares, las especies o los géneros de animales y los reactivos particulares descritos como tal pueden, por supuesto, variar. También ha de entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir solamente realizaciones particulares y no está destinada a limitar el alcance de la presente invención que se limitará solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Debe observarse que como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales salvo que el contexto lo dicte claramente de otra manera.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, la palabra “comprender” o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderán que implican la inclusión de un número entero o un grupo de números enteros citados pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

El término “anticuerpo” en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos y los fragmentos de anticuerpos siempre que muestren la actividad biológica deseada. La frase “anticuerpo multiespecífico” se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente un anticuerpo que comprende un dominio de unión a antígeno que tiene especificidad poliepitópica (es decir, es capaz de unirse específicamente a dos o más epítomos diferentes en una molécula biológica o es capaz de unirse específicamente a los epítomos en dos o más moléculas biológicas diferentes). Un ejemplo específico de un dominio de unión a antígeno es una unidad V_HV_L comprendida por un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L). Tales anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de longitud completa, anticuerpos que tienen dos o más dominios V_L y V_H , fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos biespecíficos y triacuerpos, fragmentos de anticuerpos que se han unido covalentemente o no covalentemente. Un “anticuerpo biespecífico” es un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que es capaz de unirse específicamente a dos epítomos diferentes en una molécula biológica o es capaz de unirse específicamente a los epítomos de dos moléculas biológicas diferentes. El anticuerpo biespecífico también se denomina en el presente documento que tiene “especificidad dual” o siendo “específico dual”.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,11 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo 10^{-8} M o menos, por ejemplo de 10^{-8} M a 10^{-13} M , de 10^{-9} M a 10^{-13} M) para su HER o sus HER diana.

La unidad básica del anticuerpo de cuatro cadenas es una glucoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional llamado cadena J, y por lo tanto contiene 10 sitios de unión a antígenos, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas tiene en general aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L se une a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados de forma regular. Cada cadena H tiene, en el N-terminal, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y α y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y α . Cada cadena L tiene, en el N-terminal, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que los restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. El apareamiento de un V_H y un V_L juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , γ , ϵ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases basándose en diferencias relativamente menores en la secuencia y la función de C_H , por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término “variable” se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren extensivamente en la secuencia entre anticuerpos. El dominio V media la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye firmemente a través del intervalo

de 110 aminoácidos de los dominios variables. En su lugar, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables llamados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables" o HVR. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cuatro FR, adoptando ampliamente una configuración en lámina beta, conectados por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de la estructura en lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígenos de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no se implican directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

La frase "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3) y tres en el VL (HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3). En los anticuerpos nativos, H3 y L3 muestran la mayor diversidad de los seis HVR y H3 se cree en particular que juega un papel único confiriendo especificidad fina a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). En efecto, los anticuerpos de camélidos de origen natural que consisten en una cadena pesada solamente son funcionales y estables en la ausencia de la cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Castennan et al., *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Las HVR comprenden generalmente restos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), siendo las últimas de la mayor variabilidad de secuencia y/o estando implicadas en el reconocimiento de antígenos. Un número de delineaciones de HVR está en uso y se abarca en el presente documento. Las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencias y son las más comúnmente usadas (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en su lugar a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR AbM representan un compromiso entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se usan por el software de modelado de anticuerpos Oxford Molecular's AbM. Las HVR "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se observan a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B (Numeración Kabat)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1	H31-H35 (Numeración Chothia)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 u 89-96 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en el VH. Los residuos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat et al., arriba, para cada una de estas definiciones. Los restos "Marco" o "FR" son aquellos restos del dominio variable distintos a los restos de HVR como se define en el presente documento.

La frase "numeración de restos del dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat" y las variaciones de las mismas, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de las cadenas pesadas o los dominios variables de las cadenas ligeras de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., arriba. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal actual puede contener menos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento de o una inserción en una FR o una HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo restos 82a, 82b y 82c etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se refiere a un resto en el dominio variable (aproximadamente restos 1-107 de la cadena ligera y restos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et al.,

Sequence of Immunological Interest. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o el "índice EU" se usa cuando se refiere a un resto en una región constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (por ejemplo, el índice EU informado en Kabat et al., arriba). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo EU IgG1 humano. Salvo que se indique de otra manera en el presente documento, las referencias a los números de restos en el dominio variable de los anticuerpos significa la numeración de restos por el sistema de numeración Kabat. Salvo que se indique de otra manera en el presente documento, las referencias a los números de restos en el dominio constante de los anticuerpos significa la numeración de restos por el sistema de numeración EU (por ejemplo, véase el documento WO 2006/073941).

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). Salvo que se indique de otra manera, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por métodos conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento.

Un anticuerpo "de afinidad madura" es uno con una o más alteraciones en una o más HVR o regiones marco del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación a un anticuerpo parental que no posee aquellas alteración o alteraciones. En una realización, un anticuerpo de afinidad madura tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madura pueden producirse usando ciertos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración de afinidad por redistribución de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de HVR y/o los restos marco se describe por, por ejemplo, Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci. EE.UU. 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al. J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o de región constante poseído por su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estos pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

La frase "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son sustancialmente similares y se unen a los mismos epítipo o epítomos, excepto por posibles variantes que pueden aparecer durante la producción del anticuerpo monoclonal, tales variantes estando generalmente presentes en cantidades menores. Tal anticuerpo monoclonal incluye normalmente un anticuerpo que comprende una región variable que se une a una diana, en el que el anticuerpo se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección del anticuerpo a partir de una pluralidad de anticuerpos. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon a partir de una pluralidad de clones, tales como un conjunto de clones de hibridomas, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que el anticuerpo seleccionado puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar el anticuerpo, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de la región variable alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal son ventajosas porque normalmente están sin contaminar por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obteniéndose a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no ha de construirse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usarse de acuerdo con la presente invención pueden fabricarse por diversas técnicas, incluyendo el método de hibridomas (por ejemplo, Kohler et al., Nature, 256:495 (1975); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a ed. 1988); Hammerling et al., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981), los métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 4.816.567), las tecnologías de visualización de fagos (véase, por ejemplo, Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee et al., J.Mol.Biol.340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 101(34):12467-12472 (2004); y Lee et al. J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004) y las tecnologías para producir anticuerpos humanos o anticuerpos parecidos a los humanos de animales que tienen partes o todos los loci de inmunoglobulinas humanas o genes que codifican secuencias de inmunoglobulinas humanas (véase, por ejemplo, el documento WO98/24893, el documento WO/9634096, el documento WO/9633735 y el documento WO/91 10741, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); las Patentes de EE.UU. N.º 5.545.806, N.º 5.569.825, N.º 5.591.669 (todas de GenPharm); N.º 5.545.807; el documento WO 97/17852, las Patentes de EE.UU. N.º 5.545.807; N.º 5.545.806; N.º 5.569.825; N.º 5.625.126; N.º 5.633.425; y N.º 5.661.016 y Marks et al., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-813

(1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión a antígeno así como un C_L y al menos los dominios constantes de cadena pesada C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencias nativas (por ejemplo, dominios constantes de secuencias nativas humanas) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Los "Fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpos incluyen Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la Patente de EE.UU. N.º 5.641.870, el Ejemplo 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpo de cadena única (por ejemplo scFv). Aunque en la presente descripción y a lo largo de toda la memoria descriptiva, se hace referencia a los anticuerpos y a diversas propiedades de los anticuerpos, la misma divulgación también se aplica a los fragmentos funcionales de los anticuerpos, por ejemplo los fragmentos Fab de acción dual.

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere generalmente a los anticuerpos descritos en Zapata et al., *Protein eng.*, 8(10): 1057-1062 (1995). Estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_wC_{H1}-V_HC_{H1}) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. En una realización preferida, el fragmento es "funcional", es decir retiene cualitativamente la capacidad del anticuerpo intacto correspondiente de unirse al receptor HER diana y, si el anticuerpo intacto también inhibe la activación de HER o la función, retiene cualitativamente tal propiedad inhibitoria igualmente. La retención cualitativa significa que la actividad en tipo se retiene, pero el grado de afinidad de unión y/o la actividad puede diferir.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento residual "Fc", una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. Los fragmentos Fab consisten en una cadena L entera junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio de una cadena pesada (C_{H1}). El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y todavía es capaz de entrecruzar antígenos. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab teniendo pocos restos adicionales en el carboxi terminal del dominio C_{H1} incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación del presente documento para Fab' en el que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxi-terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc; esta región también es la parte reconocida por los receptores Fc (FcR) encontrados en ciertos tipos de células.

"Fv" consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena ligera y uno de cadena pesada en asociación estrecha no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de la cadena H y L) los restos de aminoácidos que contribuyen a la unión de antígenos y confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o medio de un Fv que comprende solamente tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir antígenos, aunque normalmente a una afinidad menor que el sitio de unión entero.

"Fv de cadena única" también abreviado "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígenos. Para una revisión del sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con pequeños conectores (aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios V_H y V_L de tal manera que se logra el apareamiento inter-catenario pero no intra-catenario de los dominios V, dando como resultado un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígenos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; y hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:6444-6448 (1993).

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" como un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más, y por el contrario, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más.

El término anticuerpo “quimérico” se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o de la ligera deriva de una fuente o una especie particulares, mientras que lo que queda de la cadena pesada y/o la ligera deriva de una fuente o una especie diferentes.

5 Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano o por una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza un repertorio de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos no humanos de unión a antígenos.

10 Una “región marco consenso humana” es una región marco que representa los restos de aminoácidos de aparición más frecuente en una selección de secuencias marco de VL o VH de inmunoglobulinas humanas. Generalmente, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulinas humanas es a partir de un subgrupo de secuencias de dominios variables. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), volúmenes 1-3. En una realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat et al., arriba. En una realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat et al., arriba.

20 Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los cuales los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o un primate no humano que tiene la especificidad, la afinidad y la capacidad de anticuerpo deseadas. En algunos ejemplos, los restos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

35 Un anticuerpo de la presente invención “que se une” a un antígeno de interés es uno que se une al antígeno con suficiente afinidad de tal manera que el anticuerpo es útil como un agente diagnóstico y/o terapéutico para hacer diana una proteína o una célula o un tejido que expresa el antígeno. Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula diana, la frase “unión específica” o “se une específicamente a” o es “específico para” un polipéptido o un epítipo particulares en un polipéptido diana particular significa una unión que es mediblemente diferente de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula comparada con la unión de una molécula control. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse por competición con una molécula control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana marcada a una sonda se inhibe competitivamente por la diana en exceso no marcada. En una realización particular, “se une específicamente” se refiere a la unión de un anticuerpo a sus receptores HER diana específicos y no a otros receptores HER no diana especificados. Por ejemplo, el anticuerpo se une específicamente a EGFR y a HER3 pero no se une específicamente a HER2 o a HER4, o el anticuerpo se une específicamente a EGFR y a HER2 pero no se une específicamente a HER3 o a HER4, o el anticuerpo se une específicamente a EGFR y a HER4 pero no se une específicamente a HER2 o a HER3.

50 Un “receptor HER” es un receptor proteína tirosina quinasa que pertenece a la familia del receptor HER e incluye los receptores EGFR (ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4). El receptor HER comprenderá generalmente un dominio extracelular, que puede unir un ligando HER y/o dimerizar con otra molécula del receptor HER; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo terminal que alberga varios restos tirosina que pueden fosforilarse. El receptor HER puede ser un receptor HER de “secuencia nativa” o una “variante de secuencia de aminoácidos” del mismo. Preferentemente el receptor HER es un receptor HER humano de secuencia nativa.

60 La “ruta HER” se refiere a la red de señalización mediada por la familia del receptor HER.

Las frases “ErbB 1”, “HER 1”, “receptor del factor de crecimiento epidérmico” y “EGFR” se usan intercambiabilmente en el presente documento y se refieren al EGFR como se describe, por ejemplo, en Carpenter et al. *Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987), que incluyen formas mutantes de origen natural de los mismos (por ejemplo, un EGFR mutante de delección como en Ullrich et al, *Nature* (1984) 309:418425 y Humphrey et al. *PNAS (EE.UU.)* 87:4207-4211 (1990)), así como variantes de los mismos, tales como EGFRVIII. Las variantes del EGFR también incluyen

variantes delecionales, sustitucionales e insercionales, por ejemplo aquellas descritas en Lynch et al (New England Journal of Medicine 2004, 350:2129), Paez et al (Science 2004, 304:1497) y Pao et al (PNAS 2004, 101:13306).

En el presente documento, "dominio extracelular del EGFR" o "ECD EGFR" se refiere a un dominio del EGFR que está fuera de una célula, bien anclado a una membrana celular o bien en circulación, incluyendo fragmentos del mismo. En una realización, el dominio extracelular del EGFR puede comprender cuatro dominios: "Dominio I" (restos de aminoácido de aproximadamente 1-158), "Dominio II" (restos de aminoácido 159-336), "Dominio III" (restos de aminoácido 337-470) y "Dominio IV" (restos de aminoácido 471-645), donde los límites son aproximados y pueden variar en aproximadamente 1-3 aminoácidos.

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

En el presente documento, "dominio extracelular de HER2" o "ECD HER2" se refiere a un dominio de HER2 que está fuera de una célula, bien anclado a una membrana celular o bien en circulación, incluyendo fragmentos del mismo. En una realización, el dominio extracelular de HER2 puede comprender cuatro dominios: "Dominio I" (restos de aminoácido de aproximadamente 1-195), "Dominio II" (restos de aminoácido de aproximadamente 196-319), "Dominio III" (restos de aminoácido de aproximadamente 320-488) y "Dominio IV" (restos de aminoácido de aproximadamente 489-630) (numeración de restos sin péptido señal). Véase Garrett et al. Mol. Cell. 11: 495-505 (2003), Cho et al. Nature 421: 756-760 (2003), Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004), y Plowman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1746-1750 (1993).

"ErbB3" y "HER3" se refiere al polipéptido receptor como se desvela, por ejemplo, en las Patente de EE.UU. N.º 5.183.884 y N.º 5.480.968 así como Kraus et al. PNAS (EE.UU.) 86:9193:9197 (1989).

En el presente documento, "dominio extracelular de HER3" o "ECD HER3" se refiere a un dominio de HER3 que está fuera de una célula, bien anclado a una membrana celular o bien en circulación, incluyendo fragmentos del mismo. En una realización, el dominio extracelular de HER3 puede comprender cuatro dominios: Dominio I, Dominio II, Dominio III y Dominio IV. En una realización, el ECD HER3 comprende los aminoácidos 1-636 (numeración incluyendo el péptido señal). En una realización, el dominio III del HER3 comprende los aminoácidos 328-532 (numeración incluyendo el péptido señal).

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

Por "ligando HER" se entiende un polipéptido que se une a y/o activa un receptor HER. El ligando HER de interés particular en el presente documento es un ligando HER humano de secuencia nativa tal como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Savage et al., J. Biol. Chem. 247:7612-7621 (1972)); el factor transformante del crecimiento alfa (TGF- α) (Marquardt et al., Science 223:1079-1082 (1984)); la anfirregulina también conocida como factor de crecimiento autocrino del schwannoma o del queratinocito (Shoyab et al. Science 243:1074-1076 (1989); Kimura et al. Nature 348:257-260 (1990); y Cook et al. Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557 (1991)); la betacelulina (Shing et al., Science 259:1604-1607 (1993); y Sasada et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173 (1993)); el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) (Higashiyama et al., Science 251:936-939 (1991)); la epirregulina (Toyoda et al., J. Biol. Chem. 270:7495-7500 (1995); y Komurasaki et al. Oncogene 15:2841-2848 (1997)); una herregulina (véase a continuación); la neurregulina-2 (NRG-2) (Carraway et al., Nature 387:512-516 (1997)); la neurregulina-3 (NRG-3) (Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:9562-9567 (1997)); la neurregulina-4 (NRG-4) (Harari et al. Oncogene 18:2681-89 (1999)); y cripto (CRL-1) (Kannan et al. J. Biol. Chem. 272(6):3330-3335 (1997)). Los ligandos HER que unen EGFR incluyen EGF, TGF- α , anfirregulina, betacelulina, HB-EGF y epirregulina. Los ligandos HER que unen HER3 incluyen herregulinas y NRG-2. Los ligandos HER capaces de unir HER4 incluyen betacelulina, epirregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 y herregulinas.

"Herregulina" (HRG) cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido codificado por el producto génico de la herregulina como se desvela en la Patente de EE.UU. N.º 5.641.869 o Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993). Los ejemplos de las herregulinas incluyen herregulina- α , herregulina- β 1, herregulina- β 2 y herregulina- β 3 (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); y Patente de EE.UU. N.º 5.641.869); factor de diferenciación neu (NDF) (Peles et al. Cell 69: 205-216 (1992)); actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls et al. Cell 72:801-815 (1993)); factores de crecimiento glial (GGF) (Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993)); factor derivado de neuronas sensoriales y motoneuronas (SMDF) (Ho et al. J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995)); γ -herregulina (Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)).

Un "dímero HER" en el presente documento es un dímero asociado no covalentemente que comprende al menos dos receptores HER. Tales complejos pueden formarse cuando una célula que expresa dos o más receptores HER se expone a un ligando HER y puede aislarse por inmunoprecipitación y se analiza por SDS-PAGE como se describe en Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994), por ejemplo. Otras proteínas, tales como una subunidad del receptor de citocinas (por ejemplo gp130) puede asociarse al dímero.

Un "heterodímero HER" en el presente documento es un heterodímero asociado no covalentemente que comprende al menos dos receptores HER diferentes, tales como heterodímeros EGFR-HER2, EGFR-HER3, EGFR-HER4, HER2-HER3 o HER2-HER4.

Un "inhibidor HER" es un agente que interfiere con la activación o la función de HER. Los ejemplos de los inhibidores HER incluyen anticuerpos HER (por ejemplo anticuerpos EGFR, HER2, HER3 o HER4); fármacos dirigidos a EGFR; moléculas pequeñas antagonistas de HER; inhibidores de la tirosina quinasa HER; inhibidores duales de tirosina quinasa HER2 y EGFR tales como lapatinib/GW572016; moléculas antisentido (véase, por ejemplo, el documento WO2004/87207); y/o agentes que se unen a, o interfieren con la función de, moléculas de señalización aguas abajo, tales como MAPK o Akt. Preferentemente, el inhibidor HER es un anticuerpo que se une a un receptor HER.

Un "inhibidor de la dimerización HER" o "HDI" es un agente que inhibe la formación de un homodímero de HER o un heterodímero de HER. Preferentemente, el inhibidor de la dimerización de HER es un anticuerpo. Sin embargo, los inhibidores de la dimerización de HER también incluyen péptidos y moléculas pequeñas no peptídicas, y otras entidades químicas que inhiben la formación de los homo- o los heterodímeros de HER.

Un anticuerpo que "inhibe la dimerización de HER" es un anticuerpo que inhibe, o interfiere con, la formación de un dímero de HER, independientemente del mecanismo subyacente. En una realización, un anticuerpo tal se une al HER2 en el sitio de unión heterodimérico del mismo. Un ejemplo particular de un anticuerpo inhibidor de la dimerización es pertuzumab (Pmab) o Mab 2C4. Otros ejemplos de los inhibidores de la dimerización de HER incluyen anticuerpos que se unen al EGFR e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de los receptores HER (por ejemplo anticuerpo monoclonal EGFR 806, Mab 806, que se une al EGFR activado o "sin ataduras"; véase Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)); anticuerpos que se unen a HER3 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más otros receptores HER; anticuerpos que se unen a HER4 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más otros receptores HER; péptidos inhibidores de dimerización (Patente de EE.UU. N.º 6.417.168); inhibidores de dimerización antisentido; etc.

Como se usa en el presente documento, "antagonista de EGFR" o "inhibidor de EGFR" se refiere a aquellos componentes que se unen específicamente al EGFR y previenen o reducen su actividad señalizadora y no se unen específicamente a HER2, HER3 o HER4. Los ejemplos de tales agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen al EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen al EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, Patente de EE.UU. N.º 4.943.533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBITUX®) y 225 humano reformado (H225) (véase, documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo dirigido a EGFR completamente humano (Imclone); anticuerpos que se unen al EGFR mutante tipo II (Patente de EE.UU. N.º 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen al EGFR como se describe en la Patente de EE.UU. N.º 5.891.996; y anticuerpos humanos que unen EGFR, tales como ABX-EGF o Panitumumab (véase el documento WO98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo de EGFR humanizado dirigido contra el EGFR que compite tanto con el EGF como con el TGF alfa por la unión al EGFR (EMD/Merck); anticuerpo humano de EGFR, HuMax-EGFR (GenMab); anticuerpos completamente humanos conocidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 y E7.6.3 y descritos en el documento de EE.UU. N.º 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc); y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico, generando de esta manera un inmunocombinado (véase, por ejemplo, el documento EP659.439A2; Patente de Merck GmbH). Los antagonistas del EGFR incluyen pequeñas moléculas tales como compuestos en las Patente de EE.UU. N.º: 5.616.582, 5.457.105, 5.475.001, 5.654.307, 5.679.683, 6.084.095, 6.265.410, 6.455.534, 6.521.620, 6.596.726, 6.713.484, 5.770.599, 6.140.332, 5.866.572, 6.399.602, 6.344.459, 6.602.863, 6.391.874, 6.344.455, 5.760.041, 6.002.008 y 5.747.498, así como las siguientes publicaciones PCT: documento WO98/14451, documento WO98/50038, documento WO99/09016 y documento WO99/24037. Las moléculas pequeñas particulares antagonistas del EGFR incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-, diclorhidrato, Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA®) 4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolina, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metilpiperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidin-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletil)amino]-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butenamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida (Wyeth); AG1478 (Sugen); y AG1571 (SU 5271; Sugent).

Un "anticuerpo HER" es un anticuerpo que se une a un receptor HER. Opcionalmente, el anticuerpo HER interfiere adicionalmente con la activación o la función de HER. Los anticuerpos HER2 particulares incluyen pertuzumab y trastuzumab. Los ejemplos de anticuerpos particulares de EGFR incluyen cetuximab y panitumumab.

5 Las publicaciones de patentes relacionadas con los anticuerpos HER incluyen: EE.UU. n.º 5.677.171, EE.UU. n.º 5.720.937, EE.UU. n.º 5.720.954, EE.UU. n.º 5.725.856, EE.UU. n.º 5.770.195, EE.UU. n.º 5.772.997, EE.UU. n.º 6.165.464, EE.UU. n.º 6.387.371, EE.UU. n.º 6.399.063, documento US2002/0192211A1, EE.UU. n.º 6.015.567, EE.UU. n.º 6.333.169, EE.UU. n.º 4.968.603, EE.UU. n.º 5.821.337, EE.UU. n.º 6.054.297, EE.UU. n.º 6.407.213, EE.UU. n.º 6.719.971, EE.UU. n.º 6.800.738, documento US2004/0236078A1, EE.UU. n.º 5.648.237, EE.UU. n.º 6.267.958, EE.UU. n.º 6.685.940, EE.UU. n.º 6.821.515, documento WO98/17797, EE.UU. n.º 6.333.398, EE.UU. n.º 6.797.814, EE.UU. n.º 6.339.142, EE.UU. n.º 6.417.335, EE.UU. n.º 6.489.447, documento WO99/31140, documento US2003/0147884A1, documento US2003/0170234A1, documento US2005/0002928A1, EE.UU. n.º 6.573.043, documento US2003/0152987A1, documento WO99/48527, documento US2002/0141993A1, documento WO01/00245, documento US2003/0086924, documento US2004/0013667A1, documento WO00/69460, documento WO01/00238, documento WO01/15730, EE.UU. n.º 6.627.196B1, EE.UU. n.º 6.632.979B1, documento WO01/00244, documento US2002/0090662A1, documento WO01/89566, documento US2002/0064785, documento US2003/0134344, documento WO 04/24866, documento US2004/0082047, documento US2003/0175845A1, documento WO03/087131, documento US2003/0228663, documento WO2004/008099A2, documento US2004/0106161, documento WO2004/048525, documento US2004/0258685A1, EE.UU. n.º 5.985.553, EE.UU. n.º 5.747.261, EE.UU. n.º 4.935.341, EE.UU. n.º 5.401.638, EE.UU. n.º 5.604.107, documento WO 87/07646, documento WO 89/10412, documento WO 91/05264, EP n.º 412.116 B1, EP n.º 494.135 B1, EE.UU. n.º 5.824.311, EP n.º 444.181 B1, EP n.º 1.006.194 A2, documento US 2002/0155527A1, documento WO 91/02062, EE.UU. n.º 5.571.894, EE.UU. n.º 5.939.531, EP n.º 502.812 B1, documento WO 93/03741, EP n.º 554.441 B1, EP n.º 656.367 A1, EE.UU. n.º 5.288.477, EE.UU. n.º 5.514.554, EE.UU. n.º 5.587.458, documento WO 93/12220, documento WO 93/16185, EE.UU. n.º 5.877.305, documento WO 93/21319, documento WO 93/21232, EE.UU. n.º 5.856.089, documento WO 94/22478, EE.UU. n.º 5.910.486, EE.UU. n.º 6.028.059, documento WO 96/07321, EE.UU. n.º 5.804.396, EE.UU. n.º 5.846.749, EP n.º 711.565, documento WO 96/16673, EE.UU. n.º 5.783.404, EE.UU. n.º 5.977.322, EE.UU. n.º 6.512.097, documento WO 97/00271, EE.UU. n.º 6.270.765, EE.UU. n.º 6.395.272, EE.UU. n.º 5.837.243, documento WO 96/40789, EE.UU. n.º 5.783.186, EE.UU. n.º 6.458.356, documento WO 97/20858, documento WO 97/38731, EE.UU. n.º 6.214.388, EE.UU. n.º 5.925.519, documento WO 98/02463, EE.UU. n.º 5.922.845, documento WO 98/18489, documento WO 98/33914, EE.UU. n.º 5.994.071, documento WO 98/45479, EE.UU. n.º 6.358.682 B1, documento US 2003/0059790, documento WO 99/55367, documento WO 01/20033, documento US 2002/0076695 A1, documento WO 00/78347, documento WO 01/09187, documento WO 01/21192, documento WO 01/32155, documento WO 01/53354, documento WO 01/56604, documento WO 01/76630, documento WO02/05791, documento WO 02/11677, EE.UU. n.º 6.582.919, documento US2002/0192652A1, documento US 2003/0211530A1, documento WO 02/44413, documento US 2002/0142328, EE.UU. n.º 6.602.670 B2, documento WO 02/45653, documento WO 02/055106, documento US 2003/0152572, documento US 2003/0165840, documento WO 02/087619, documento WO 03/006509, documento WO03/012072, documento WO 03/028638, documento US 2003/0068318, documento WO 03/041736, EP n.º 1.357.132, documento US 2003/0202973, documento US 2004/0138160, EE.UU. n.º 5.705.157, EE.UU. n.º 6.123.939, EP n.º 616.812 B1, documento US 2003/0103973, documento US 2003/0108545, EE.UU. n.º 6.403.630 B1, documento WO 00/61145, documento WO 00/61185, EE.UU. n.º 6.333.348 B1, documento WO 01/05425, documento WO 01/64246, documento US 2003/0022918, documento US 2002/0051785 A1, EE.UU. n.º 6.767.541, documento WO 01/76586, documento US 2003/0144252, documento WO 01/87336, documento US 2002/0031515 A1, documento WO 01/87334, documento WO 02/05791, documento WO 02/09754, documento US 2003/0157097, documento US 2002/0076408, documento WO 02/055106, documento WO 02/070008, documento WO 02/089842 y documento WO 03/86467.

50 "Activación de HER" se refiere a la activación, o la fosforilación, de uno cualquiera o más receptores HER. Generalmente, la activación de HER da como resultado la transducción de señales (por ejemplo aquella causada por un dominio quinasa intracelular de un receptor HER que fosforila restos tirosina en el receptor HER o un polipéptido sustrato). La activación de HER puede mediarse por el ligando de HER que se une a un dímero HER que comprende el receptor HER de interés. El ligando HER que se une a un dímero HER puede activar un dominio quinasa de uno o más de los receptores HER en el dímero y de esta manera da como resultado la fosforilación de los restos tirosina en uno o más de los receptores HER y/o a fosforilación de los restos tirosina en polipéptido o polipéptidos sustrato adicionales, tales como quinasas intracelulares MAPK o Akt.

60 "Fosforilación" se refiere a la adición de uno o más grupo o grupos fosfato a una proteína, tal como un receptor HER, o un sustrato del mismo.

Un "sitio de unión heterodimérico" en HER2, se refiere a una región en el dominio extracelular de HER2 que contacta, o tiene interfaz con, una región en el dominio extracelular de EGFR, HER3 o HER4 tras la formación de un dímero en el mismo. La región se encuentra en el Dominio II del HER2. Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004).

65 Un anticuerpo HER2 que "se une a un sitio de unión heterodimérico" de HER2, se une a los restos del dominio II (y opcionalmente también se une a los restos en otro de los dominios del dominio extracelular de HER2, tales como los

dominios I y III) y puede impedir estéricamente, al menos en algún grado, la formación de un heterodímero HER2-EGFR, HER2-HER3 o HER2-HER4. Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004) caracteriza la estructura cristalina de HER2-pertuzumab, depositada con el Banco de Datos de Proteínas RCSB (Código de ID IS78), ilustrando un anticuerpo ejemplar que se une al sitio de unión heterodimérico de HER2.

Un anticuerpo que “se une al dominio II” del HER2 se une a los restos del dominio II y opcionalmente a los restos en otro dominio o dominios del HER2, tales como los dominios I y III.

“Aislado”, cuando se usa para describir los diversos anticuerpos desvelados en el presente documento, significa un anticuerpo que se ha identificado y se ha separado y/o se ha recuperado de una célula o de un cultivo celular del que se expresó. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían normalmente con el diagnóstico o con los usos terapéuticos para el polipéptido y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna usando un secuenciador de copa giratoria o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando azul Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye anticuerpos *in situ* con células recombinantes, porque al menos un componente del medio natural del polipéptido no estará presente. De forma ordinaria, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará por al menos una etapa de purificación. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-HER multiespecífico es un anticuerpo aislado.

La frase “secuencias control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias control que son adecuadas para los procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o un líder secretor se une operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o un potenciador se une operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si se posiciona de tal manera que facilite la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no han de ser contiguos. La unión se cumple por ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se usan adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácido en la secuencia del polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias y de introducir los huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje de identidad de secuencia máximo, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas formas que están dentro de la experiencia en la materia, por ejemplo, usando software de ordenador disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencias de aminoácidos se generan usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 fue realizado por Genentech, Inc., y el código de fuente se ha llenado con documentación de usuario en la Copyright Office de los EE.UU., Washington D.C., 20559, donde se registró bajo el N.º de Registro de Derechos de Autor de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a partir de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para usarse en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-1 y no varían.

En las situaciones donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia A de aminoácidos dada, con o contra una secuencia B de aminoácidos dada (que puede expresarse alternativamente como una secuencia A de aminoácidos dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos a, con o contra una secuencia B de aminoácidos dada) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de restos de aminoácidos clasificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en ese alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de la secuencia A de aminoácidos no es igual a la

longitud de la secuencia B de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. Salvo que se indique específicamente de otra manera, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa de ordenador ALIGN-2.

5 El "rigor" de las reacciones de hibridación es fácilmente determinable por un experto en la materia y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, de la temperatura de lavado y de la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren mayores temperaturas para un alineamiento adecuado, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas menores. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado de realinearse cuando están presentes hebras complementarias en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, sigue que mayores temperaturas relativas tenderían a hacer las condiciones de reacción más estrictas, mientras que menores temperaturas lo harían menos. Para detalles adicionales y explicación del rigor de las reacciones de hibridación, véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

20 Las "condiciones estrictas" o "condiciones de alto rigor", como se define en el presente documento, pueden identificarse por aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1 % a 50 °C; (2) emplear durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bobino al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C; o (3) hibridación durante toda la noche en una solución que emplea formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1 %, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón tratado por ultrasonidos (50 µg/ml), SDS al 0,1 % y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C, con un lavado de 10 minutos a 42 °C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) seguido de un lavado de alto rigor de 10 minutos que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C.

30 Las "condiciones moderadamente estrictas" pueden identificarse como se describe por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de una solución de lavado y de condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos estrictas que aquellas descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente estrictas es incubación durante toda la noche a 37 °C en una solución que comprende: formamida al 20 %, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 % y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado, seguido de lavar los filtros en 1 x SDS a aproximadamente 37-50 °C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. como sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

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

45 La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida sobre receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que lleva un antígeno y posteriormente matan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y se requieren absolutamente para tal muerte. Las células principales para mediar la ADCC, las células NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de EE.UU. N.º 5.500.362 o N.º 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquel desvelado en Clynes et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*) 95:652-656 (1998).

60 "Receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de estos receptores alternativamente cortadas y empalmadas. Los receptores FcγRII incluyen el FcγRIIA (un "receptor activador") y el FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en el inmunorreceptor de tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en el inmunorreceptor de tirosina (ITIM) en su dominio

citoplasmático (véase la revisión M. en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas e tal., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo aquellos a identificarse en el futuro, se abarcan por el término “FcR” del presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan una función efectora ADCC. Los ejemplos de los leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; siendo preferidas las PBMC y las células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

“Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la ruta clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

Como se usa en el presente documento, “tratamiento” (y las variaciones gramaticales del mismo tales como “tratar” o “tratando”) se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el transcurso natural del individuo a tratarse, y puede realizarse bien por profilaxis o bien durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, la prevenir la aparición o la reaparición de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad del avance de la enfermedad, aliviar o paliar el estado de la enfermedad y la remisión o la prognosis mejorada. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo o para ralentizar el avance de una enfermedad.

La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto. En el caso de un tumor (por ejemplo, un tumor canceroso), la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo puede reducir el número de células cancerígenas, reducir el tamaño primario del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferentemente parar) la infiltración de las células cancerígenas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferentemente parar) la metástasis del tumor; inhibir, en algún grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en algún grado uno o más de los síntomas asociados al trastorno. Hasta el grado de que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo puedan prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerígenas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficiencia *in vivo* puede, por ejemplo, medirse evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo del avance de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.

Por “reducir o inhibir” se entiende la capacidad de provocar una disminución global preferentemente del 20 % o mayor, más preferentemente del 50 % o mayor y más preferentemente del 75 %, del 85 %, del 90 %, del 95 % o mayor. Reducir o inhibir puede referirse a los síntomas del trastorno a tratarse, la presencia o el tamaño de la metástasis, el tamaño del tumor primario o el tamaño o el número de los vasos sanguíneos en trastornos angiogénicos.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en los mamíferos que se caracteriza normalmente por el crecimiento celular sin regular. En esta definición se incluyen los cánceres benignos y malignos. Por “cáncer en fase temprana” se entiende un cáncer que no es invasivo o metastásico o se clasifica como un Cáncer de Fase 0, I, o II.

El término “precanceroso” se refiere a una afección o a un crecimiento que precede normalmente o se desarrolla en un cáncer.

Por “no metastásico” se entiende un cáncer que es benigno o que se mantiene en el sitio primario y no ha penetrado en el sistema de vasos linfáticos o sanguíneos o a los tejidos distintos del sitio primario. Generalmente, un cáncer no metastásico es cualquier cáncer que está en un Cáncer en fase 0, I o II, y ocasionalmente un Cáncer en fase III.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto a un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, un excipiente, un estabilizante o un conservante.

La frase “terapia anti-cáncer” se refiere a una terapia útil tratando el cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos anti-cáncer incluyen, pero se limitan a, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en terapia de radiación, agentes anti-angiogénesis, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina y otros agentes para tratar el cáncer, anticuerpos anti-CD20, inhibidores del factor

decrecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, Gleevec™ (Mesilato de Imatinib)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a una o más de las siguientes dianas receptor o receptores EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o VEGF, TRAIL/Apo2 y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos. Las combinaciones de los mismos también se incluyen en la invención.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; spongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediína (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma1 y calicheamicina megal1 (véase, por ejemplo, Nicolaou et al., *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor oral de la integrina alfa-4; dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediína relacionados con cromoproteínas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección liposómica de doxorubicina HCl (DOXIL®), doxorubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina pegilada liposómica (CAELYX®) y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, streptonigrina, streptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofuro, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenos del ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiourea; lentinán; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK® complejo polisacárido (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2'-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas de albúmina de ingeniería de paclitaxel (ABRAXANE™) y docetaxel (TAXOTERE®); cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®), y carboplatino; vincas, que previenen la polimerización de las tubulinas de los microtúbulos que se forman, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y vindorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibironato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, que incluyen bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano del nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo celecoxib o etoricoxib), inhibidor del proteasoma (por ejemplo PS341); bortezomib (VELCADE®); CCT-779; tipifarnib (RI 1577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase la definición a continuación); inhibidores de la tirosina quinasa (véase la definición a continuación); inhibidores de serina-treonina quinasa tales como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores de la farnesiltransferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera

de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviación de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona; y FOLFOX, una abreviación de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

5 Los agentes quimioterapéuticos como se define en el presente documento incluyen “agentes anti-hormonales” o “terapéuticos endocrinos” que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Pueden ser hormonas por sí mismas, incluyendo, pero no limitado a: anti-estrógenos con perfil mezclado agonista/antagonista, incluyendo tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, keoxifeno y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM) tales como SERM3; anti-estrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®) y EM800 (tales agentes pueden bloquear la dimerización del receptor de estrógenos (ER), inhibir la unión al ADN, aumentar la rotación de ER y/o suprimir los niveles de ER); inhibidores de la aromatasa, incluyendo inhibidores esteroideos de la aromatasa tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida y otros inhibidores de la aromatasa incluyen vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol y 4(5)-imidazoles; agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante, incluyendo leuprolida (LUPRON® and ELIGARD®), goserelina, busarelina y tripterelina; esteroides sexuales, incluyendo progestinas tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilestilbestrol y premarina y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, todo el ácido transretinoico y fenretinida; onapristona; anti-progesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Un “sujeto” es un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, humanos, primates superiores no humanos, primates, animales de granja (tales como vacas), animales deportivos, mascotas (tales como perros, gatos y caballos) y animales de laboratorio (tales como ratones y ratas).

II. Descripción detallada

30 La presente divulgación proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpo funcionales, que comprenden al menos un dominio de unión a antígeno que tiene especificidad de unión por al menos dos receptores HER diferentes, en particular EGFR y HER2, EGFR y HER3 o EGFR y HER4. Estos anticuerpos multiespecíficos son distintos de los anticuerpos multiespecíficos tradicionales que tienen dominios de unión a antígenos (normalmente dos) con diferentes especificidades de unión. En ciertas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos descritos en el presente documento tienen la estructura molecular de una IgG (o Fab) y de esta manera retienen atributos favorables de una IgG para el desarrollo terapéutico, tales como propiedades farmacocinéticas predecibles, protocolos de fabricación bien establecidos, elección de funciones efectoras mediadas por Fc y bi- o mono-valencias. Estos atributos favorables están normalmente carentes en los anticuerpos multiespecíficos tradicionales que derivan ensamblando dos fragmentos de anticuerpos distintos en una molécula.

Los anticuerpos multiespecíficos descritos en el presente documento y los fragmentos de anticuerpos funcionales de los mismos, son útiles para el tratamiento de enfermedades o afecciones, tales como cánceres, que se asocian a las rutas del receptor HER. En una realización particular, el dominio de unión a antígeno del anticuerpo multiespecífico se une específicamente tanto a EGFR como a HER3. En otra realización, el dominio de unión a antígeno se une específicamente tanto a EGFR como a HER2. En otra realización, el dominio de unión a antígeno se une específicamente tanto a EGFR como a HER4.

Un aspecto particular de la divulgación proporciona anticuerpos que comprenden dos (o más) dominios de unión a antígeno, cada uno de los cuales tiene la misma especificidad de unión.

La divulgación proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende dos dominios de unión a antígenos, donde cada dominio de unión a antígenos tiene la misma especificidad y se une específicamente a dos receptores HER diferentes. En un caso particular, cada dominio de unión a antígeno se une específicamente tanto al EGFR como al HER3. En otro caso, cada dominio de unión a antígeno se une específicamente tanto al EGFR como al HER2. En otro caso, cada dominio de unión a antígeno se une específicamente tanto al EGFR como al HER4. Todavía en otro caso, cada dominio de unión a antígeno se une específicamente al Dominio III del EGFR. En otro caso, cada dominio de unión a antígeno se une específicamente al Dominio III del HER3. Todavía en otro caso, cada dominio de unión a antígeno es capaz de unirse al Dominio III del EGFR y al dominio del HER3.

En particular, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a su receptor HER o a sus receptores HER diana y no se une específicamente a los receptores HER no diana. En consecuencia, el anticuerpo multiespecífico puede unirse específicamente al EGFR y al HER3 pero no se une específicamente al HER2 o al HER4, se une específicamente al EGFR y al HER2 pero no se une específicamente al HER3 o al HER4 o se une específicamente al EGFR y al HER4 pero no se une específicamente al HER2 y al HER3.

En ciertas realizaciones, cada dominio de unión a antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L). En un caso, la unidad V_HV_L se une específicamente a dos receptores HER diferentes. En particular, la unidad V_HV_L se une específicamente al EGFR y al HER3. En otro caso, la unidad V_HV_L se une específicamente al EGFR y al HER2. En otro caso, la unidad V_HV_L se une específicamente al EGFR y al HER4.

5 En realizaciones particulares, la afinidad del anticuerpo multiespecífico por su receptor o sus receptores HER diana se indica por una K_d de menos de 10^{-5} M, menos de 10^{-6} M, menos de 10^{-7} M, menos de 10^{-8} M, menos de 10^{-9} M, menos de 10^{-10} M, menos de 10^{-11} M o menos de 10^{-12} M. En una realización, la K_d del anticuerpo para uno de sus receptores diana es menos de 10^{-7} M, menos de 10^{-8} M, menos de 10^{-9} M, menos de 10^{-10} M o menos de 10^{-11} M. En otra realización, la K_d del anticuerpo multiespecífico para todos sus receptores diana es menos de 10^{-7} M, menos de 10^{-8} M, menos de 10^{-9} M, menos de 10^{-10} M, menos de 10^{-11} M o menos de 10^{-12} M.

15 En algunas realizaciones, la afinidad del anticuerpo multiespecífico para uno de sus receptores HER diana es mayor que para su otro receptor o receptores HER diana. En una realización, la afinidad del anticuerpo multiespecífico por un receptor HER diana es al menos 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40, 50, 100 veces mayor que su afinidad por otro receptor HER diana. En una realización, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente al EGFR y a otro receptor HER y su afinidad de unión por el otro receptor HER es al menos 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40, 50 o 100 veces mayor que su afinidad por el EGFR. En una realización, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente al EGFR y al HER3 y su afinidad de unión por el HER3 es al menos 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40, 50 o 100 veces mayor que su afinidad por el EGFR. En otra realización, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente al EGFR y al HER2 y su afinidad de unión por el HER2 es al menos 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40, 50 o 100 veces mayor que su afinidad por el EGFR. En otra realización, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente al EGFR y al HER4 y su afinidad de unión por el HER4 es al menos 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40, 50 o 100 veces mayor que su afinidad por el EGFR.

25 En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención inhiben una actividad biológica de al menos uno de los receptores HER a los que se unen específicamente. En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención inhiben una actividad biológica de ambos de los receptores HER a los que se unen específicamente. De esta manera, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico puede inhibir una actividad biológica de un receptor EGFR y/ un HER2 y/o un HER3 y/o un HER4.

30 En una realización, el anticuerpo multiespecífico se une al EGFR humano y al HER3 humano e inhibe una actividad biológica de al menos el EGFR. En otra realización, el anticuerpo multiespecífico se une al EGFR humano y al HER3 humano e inhibe al menos una actividad biológica del HER3. En otra realización, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente al EGFR humano y al HER3 humano e inhibe una actividad biológica tanto del EGFR como del HER3.

35 En otro caso, el anticuerpo multiespecífico se une al EGFR humano y al HER2 humano e inhibe al menos una actividad biológica del EGFR. Todavía en otro caso, el anticuerpo se une específicamente al EGFR humano y al HER2 humano e inhibe al menos una actividad biológica del HER2. Todavía en otro caso, el anticuerpo se une específicamente al EGFR humano y al HER2 humano e inhibe una actividad biológica tanto del EGFR como del HER2.

40 En otro caso, el anticuerpo se une específicamente al EGFR humano y al HER4 humano e inhibe una actividad biológica de al menos el EGFR. En otro caso, el anticuerpo se une específicamente al EGFR humano y al HER4 humano e inhibe al menos una actividad biológica del HER4. En otro caso, el anticuerpo se une específicamente al EGFR humano y al HER4 humano e inhibe una actividad biológica tanto del EGFR como del HER4.

45 En ciertos casos, los anticuerpos del presente documento inhiben una actividad biológica dirigida, al menos parcialmente, por un receptor HER al que no se unen. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen al EGFR y al HER3 pueden aún ser capaces de inhibir una actividad biológica dirigida por el HER2.

50 La inhibición de una actividad biológica puede medirse en ensayos bien conocidos en la técnica. De esta manera, por ejemplo, los anticuerpos en el presente documento pueden inhibir la fosforilación de uno más de los receptores HER y/o pueden inhibir la unión de un ligando HER a su receptor y/o pueden inhibir la proliferación inducida por ligando de las células que expresan el receptor HER y/o pueden inhibir aguas abajo las rutas de señalización que se activan a través de un receptor HER.

55 Dos rutas principales de señalización aguas abajo que se activan en respuesta a la fosforilación del EGFR son las rutas de Ras/MAPK y de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt. Por lo tanto, la capacidad de un anticuerpo del presente documento de inhibir la actividad biológica del receptor HER puede medirse evaluando si puede bloquear la activación de estas rutas, por ejemplo en las células NR6. De esta manera, puede medirse la capacidad de los anticuerpos para bloquear la fosforilación inducida por ligando de p44/42MAPK, pAKT u otras moléculas de señalización aguas abajo. La señalización del HER3 también se ha implicado en muchas otras rutas, incluyendo c-met y FGFR. La capacidad de un anticuerpo del presente documento para inhibir la actividad biológica de un

receptor HER puede medirse evaluando si puede bloquear la activación de estas rutas.

Un aspecto de la invención proporciona anticuerpos multiespecíficos que se generan diversificando un anticuerpo con especificidad por un receptor HER de tal manera que desarrolle especificidad por un segundo receptor HER reteniendo la especificidad por el primer receptor HER. En términos genéricos, este método comprende las etapas de (1) diversificar la secuencia de aminoácidos de un dominio de variable de cadena ligera (V_L) de un anticuerpo, en el que antes de la diversificación, el anticuerpo comprendía un V_L y un dominio variable de cadena pesada (V_H) capaces de unirse a un epítipo en el primer receptor HER y (2) seleccionar un anticuerpo diversificado capaz de unirse al epítipo del primer receptor HER y a un epítipo en un segundo receptor HER. Estas etapas pueden repetirse para generar anticuerpos multi-específicos. Se proporciona una descripción detallada de este método en la Patente de Estados Unidos con N.º de Publicación 20080069820. Este método se ilustra adicionalmente en los Ejemplos. En el método descrito en los Ejemplos, se usa un anticuerpo anti-EGFR como molde para la diversificación y de esta manera para la preparación de anticuerpos anti-HER multiespecíficos, sin embargo, otros anticuerpos anti-HER, tales como los anticuerpos anti-HER2, anti-HER3 o anti-HER4 podrían servir también como molde.

La divulgación proporciona adicionalmente anticuerpos mono-específicos que son capaces de unirse específicamente a un receptor HER y no se unen específicamente a los otros receptores HER. En un caso, el anticuerpo se une específicamente al ECFR. En un caso, el anticuerpo se une específicamente al Dominio III del EGFR. En algunos casos, el anticuerpo se une específicamente al EGFR e inhibe una actividad biológica del EGFR. En otro caso, el anticuerpo se une específicamente al HER3. En un caso, el anticuerpo se une específicamente al Dominio III del HER3. En algunos casos, el anticuerpo se une específicamente al HER3 e inhibe una actividad biológica del HER3.

Los anticuerpos mono-específicos pueden usarse como el anticuerpo molde para la diversificación adicional para añadir especificidad de unión a otros receptores HER o a otros antígenos diana.

Toxicidad

La toxicidad de los antagonistas del EGFR está bien documentada tanto en estudios pre-clínicos como clínicos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-EGFR cetuximab muestra diversas formas de toxicidad a niveles terapéuticamente eficaces. Las reacciones adversas más comunes con el cetuximab (ERBITUX®, Imclone) (incidencia ≥ 25 %) son reacciones cutáneas adversas (incluyendo erupciones, purito y cambios en las uñas), dolor de cabeza, diarrea e infección. Las reacciones adversas más graves asociadas al tratamiento con cetuximab son reacciones de infusión, parada cardiorrespiratoria, toxicidad dermatológica y dermatitis por radiación, sepsis, fallo renal, enfermedad intersticial del pulmón y émbolo pulmonar, véase, Biologics License Agreement (BLA) para el cetuximab (N.º de solicitud: 125084) (incorporado por referencia en el presente documento). Se observan problemas de toxicidad similares para el panitumumab (VECTIBIX® Amgen) donde la toxicidad dermatológica se dio en el 89 % de los pacientes a los que se administró este anticuerpo. Estas toxicidades eran graves, CTC de grado 3 y mayores (VECTIBIX® etiqueta de FDA).

El agente quimioterapéutico anti-EGFR erlotinib se ha informado que provoca, en algunos casos, fallo renal agudo o insuficiencia renal, fallo hepático y/o síndrome hepatorenal, perforaciones gastrointestinales, ampollas y trastornos exfoliativos de la piel y úlcera y perforación de la córnea. Véase, el etiquetado de seguridad de FDA *Warnings and Precautions* para el erlotinib (TARCEVA®, Genentech, OSI Pharmaceuticals) (2009).

“Tóxico” o “toxicidad” se refiere a cualquier efecto adverso causado por un agente cuando se administra a un sujeto. Las mediciones de la toxicidad incluyen, pero no se limitan a, mortalidad, pérdida de peso corporal, fallo orgánico, función alterada de los órganos, toxicidad del sistema nervioso central, toxicidad gastrointestinal (como se indica, por ejemplo, por la diarrea), toxicidad dermatológica (como se indica, por ejemplo, por la aparición de erupciones, lesiones de la piel, descamación o purito), toxicidad cardíaca, infección, sepsis y citotoxicidad.

La toxicidad puede determinarse por métodos conocidos en la técnica tales como monitorizar observaciones secundarias en una jaula clínica, peso corporal, consumo de alimentos, tasa de respiración, medidas de oximetría de pulso, examinación física, evaluaciones oftálmicas, evaluaciones neurológicas, parámetros metabólicos, parámetros cardiovasculares, patología clínica (incluyendo química clínica, hematología, urinalisis y parámetros de coagulación) y patología macroscópica y microscópica.

Los Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos v3.0 (CTCAE) preparados por el National Cancer Institute (incorporado por referencia en su totalidad en el presente documento) proporcionan información con respecto a indicadores aceptados particulares de toxicidad en sujetos humanos. La Figura 31 proporciona información con respecto a las toxicidades observadas no clínicas y clínicas para las terapias de antagonistas del EGFR.

La toxicidad puede medirse en términos de eventos tóxicos totales o gravedad del evento/eventos tóxicos. La gravedad de los eventos puede describirse usando el sistema de gradación establecido en los CTCAE. Los grados

se asignan a cada evento adverso usando descripciones clínicas únicas de gravedad basadas en las directrices generales de que Grado 1 se refiere a un evento suave, Grado 2 se refiere a un evento moderado, Grado 3 se refiere a un evento grave, Grado 4 se refiere a un evento que amenaza o inhabilita la vida y Grado 5 se refiere a una muerte relacionada con el evento. Los CTCAE proporcionan las descripciones clínicas específicas para los eventos tóxicos. Los descriptores para la toxicidad dermatológica se proporcionan al principio en la página 14 de los CTCAE, v3. Como ejemplo, la Figura 32 muestra la gradación de la erupción/descamación y del acné/erupción acneiforme (CTCAE, v.3). Hay un número de modelos conocidos en la técnica que se usan para monitorizar indicadores potenciales de toxicidad, incluyendo, pero no limitados a, modelos basados en células *in vitro* y modelos animales no humanos *in vivo*. La toxicidad también se monitoriza en sujetos humanos en estudios de pruebas clínicas.

En una realización particular, la toxicidad se mide en macacos cangrejeros. El efecto tóxico de los antagonistas del EGFR en los macacos cangrejeros está bien documentado. Como se expone en el Biologies License Agreement (BLA) para el cetuximab (N.º de Solicitud: 125084), incorporado en el presente documento por referencia), todos los monos que recibieron cetuximab mostraron lesiones suaves a graves en la piel, que consistían en formación de incrustaciones, enrojecimiento, eritema, dermatitis, fisuras, heridas y exantema y/o caída o pérdida del cabello. La toxicidad dermatológica era dependiente de la dosis tanto en gravedad como en tiempo de aparición, donde la gravedad para las dosis altas, medias y bajas era grave, moderada y suave y el tiempo de aparición se dio en los Días de Estudio 15, 22 y 64, respectivamente. Las complicaciones secundarias de las lesiones graves de la piel fueron infección bacteriana o sepsis con posterior mortalidad o eutanasia del 50 % de los animales en el grupo de mayor dosis. Otras toxicidades relacionadas con la dosis incluyeron cambios en ciertos parámetros de patología clínica asociados a la evidencia macroscópica y microscópica del daño celular y tisular en el hígado, en la médula ósea, en el bazo y en los órganos linfoides.

Como se expone en los Ejemplos, los macacos cangrejeros a los que se ha administrado un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al EGFR y al HER3 mostraron menores incidencias de toxicidad, como se indica por las lesiones dérmicas, en comparación con los macacos cangrejeros a los que se ha administrado una cantidad igual del antagonista de EGFR cetuximab. Uno de los tres macacos cangrejeros a los que se ha administrado 25 mg/kg del anticuerpo biespecífico desarrollaron lesiones dérmicas mientras que 3 de los 3 macacos cangrejeros a los que se han administrado 25 mg/kg de cetuximab desarrollaron lesiones dérmicas. La lesión que apareció en un mono al que se ha administrado anticuerpo biespecífico era menos grave que las lesiones de los monos a los que se ha administrado cetuximab y la aparición de la lesión se retrasó. El animal al que se ha administrado el anticuerpo biespecífico desarrolló la lesión de la piel una semana después de la última (sexta) dosis en comparación con los monos a los que se ha administrado cetuximab donde la aparición de las lesiones dérmicas se dio después de la tercera dosis en todos los animales.

En estudios clínicos del cetuximab, se observaron las toxicidades dermatológicas, incluyendo la erupción acneiforme, el secado de la piel y la aparición de fisuras y las secuelas infecciosas. La incidencia informada de la toxicidad dermatológica fue tan grande como el 89 % (para aquellos pacientes con cáncer colorrectal avanzado).

Los modelos de toxicidad dermatológica se conocen y pueden usarse para determinar la toxicidad dermatológica de los anticuerpos. Los ejemplos de tales modelos incluyen los queratinocitos epidérmicos humanos (NHEK (Clonetics, San Diego, CA; Lonza Bioscience, Walkersville, MD)); HEKa (Cascade Biologics, Portland, OR; Invitrogen, Carlsbad, CA) y epidermis humana reconstruida (cultivos de EpiDerm™ (MatTek, Ashland, MA)). Estos modelos pueden usarse para examinar el efecto de los anticuerpos en la proliferación celular, la expresión génica, la presión proteica, la fosforilación de receptores, la viabilidad celular y los cambios en la histopatología. Lacouture, M.E., Nature Rev. Cnncer, 6:803-812 (2006).

Es deseable proporcionar un anticuerpo menos tóxico que marque como diana la ruta de EGFR. La dosificación de los antagonistas del EGFR tales como cetuximab se limita por la toxicidad (toxicidad principalmente dermatológica y reacciones de infusión). Un anticuerpo menos tóxico podría administrarse a una dosis mayor que un antagonista de EGFR más tóxico que puede dar como resultado efectos antitumorales aumentados. En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que se une específicamente al EGFR y al menos otro receptor HER (HER2, HER3 y/o HER4), donde el anticuerpo es menos tóxico que un antagonista del EGFR cuando el anticuerpo y el antagonista del EGFR se administran en dosis equivalentes. En una realización, el anticuerpo se une específicamente al EGFR y al HER3. En otra realización, el anticuerpo se une específicamente al EGFR y al HER2. Todavía en otra realización, el anticuerpo se une específicamente al EGFR y al HER4.

En algunas realizaciones el anticuerpo multiespecífico induce una incidencia menor de las toxicidades, toxicidades menos graves o aparición retrasada de las toxicidades en un modelo *in vivo* en comparación con un antagonista del EGFR. Un aspecto proporciona un anticuerpo multiespecífico que se une específicamente al EGFR y al menos un otro receptor HER (HER2, HER3 y/o HER4) donde el anticuerpo induce menos incidentes de toxicidad en sujetos a los que se ha administrado el anticuerpo en comparación con los incidentes de toxicidad en sujetos a los que se ha administrado un antagonista del EGFR. En realizaciones particulares, el número de incidentes de toxicidad en los sujetos a los que se administra el anticuerpo es al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % menos que el número de incidentes de toxicidad en los sujetos a los que se administra un antagonista del EGFR.

En otras realizaciones, la tasa de incidentes de toxicidad en sujetos a los que se administra el anticuerpo es menos del 80 %, del 70 %, del 60 %, del 50 %, del 40 %, del 30 %, del 20 %, del 10 %, del 5 %, del 2 % o del 1 %.

5 En realizaciones particulares el anticuerpo multiespecífico induce una incidencia menor de las toxicidades dermatológicas, toxicidades dermatológicas menos graves o la aparición retrasada de las toxicidades dermatológicas en un modelo *in vivo* en comparación con un antagonista del EGFR. Un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que se une específicamente al EGFR y al menos a un otro receptor HER (HER2, HER3 y/o HER4) donde el anticuerpo induce menos incidentes de toxicidad dermatológica totales en los
10 sujetos a los que se administra el anticuerpo en comparación con los incidentes de toxicidad dermatológica totales en los sujetos a los que se administra un antagonista del EGFR. En realizaciones particulares, el número total de incidentes de toxicidad dermatológica en los sujetos a los que se administra el anticuerpo es al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % menos que el número total de incidentes de toxicidad dermatológica en los sujetos a los que se administra un antagonista del EGFR.

15 En otras realizaciones, la tasa de incidentes totales de toxicidad dermatológica en sujetos a los que se administra el anticuerpo es menos del 80 %, del 70 %, del 60 %, del 50 %, del 40 %, del 30 %, del 20 %, del 10 %, del 5 %, del 2 % o del 1 %.

20 Otro aspecto proporciona un anticuerpo multiespecífico que se une específicamente al EGFR y al menos un otro receptor HER (HER2, HER3 y/o HER4) donde el anticuerpo induce menos incidentes de toxicidad de grado 3 o mayor en los sujetos a los que se administra el anticuerpo en comparación con los incidentes de toxicidad de grado 3 o mayor en los sujetos a los que se administra un antagonista del EGFR. En realizaciones particulares, el número de incidentes de toxicidad de grado 3 o mayor en los sujetos a los que se administra el anticuerpo es al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % menos que el número de incidentes de toxicidad de grado 3 o mayor en los sujetos a los que se administra un antagonista del EGFR.

25 En otras realizaciones, la tasa de los incidentes de toxicidad de grado 3 o mayor en los sujetos a los que se administra el anticuerpo son menos del 70 %, del 60 %, del 50 %, del 40 %, del 30 %, del 20 %, del 15 %, del 12 %, del 11 %, del 10 %, del 9 %, del 8 %, del 7 %, del 6 %, del 5 %, del 4 %, del 3 %, del 2 % o del 1 %.

30 En realizaciones particulares, el anticuerpo multiespecífico induce incidentes de toxicidad dermatológica menores de grado 3 o mayor en sujetos a los que se les administró el anticuerpo biespecífico en comparación con los incidentes de toxicidad dermatológica de grado 3 o mayor en sujetos a los que se administró un antagonista del EGFR. En realizaciones particulares, el número de incidentes de toxicidad dermatológica de grado 3 o mayor en los sujetos a los que se administra el anticuerpo es al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % menos que el número de incidentes de toxicidad dermatológica de grado 3 o mayor en los sujetos a los que se administra un antagonista del EGFR.

35 En otras realizaciones, la tasa de los incidentes de toxicidad dermatológica de grado 3 o mayor en los sujetos a los que se administra el anticuerpo son menos del 70 %, del 60 %, del 50 %, del 40 %, del 30 %, del 20 %, del 15 %, del 12 %, del 11 %, del 10 %, del 9 %, del 8 %, del 7 %, del 6 %, del 5 %, del 4 %, del 3 %, del 2 % o del 1 %.

40 En otros casos, el anticuerpo induce menores incidencias de función orgánica alterada en un modelo *in vivo* en comparación con un antagonista del EGFR. En otros casos, el anticuerpo induce menos, o menos graves, toxicidades gastrointestinales en un modelo *in vivo* en comparación con un antagonista del EGFR.

45 En alguna realización, el antagonista del EGFR es un anticuerpo anti-EGFR. En una realización, el antagonista del EGFR es cetuximab. En otro caso, el antagonista del EGFR es panitumumab. En otro caso, el antagonista del EGFR es una molécula pequeña. En un caso, el antagonista del EGFR es erlotinib. En una realización, el modelo *in vivo* es un mono, tal como un macaco cangrejero. En otro caso, el modelo *in vivo* es un humano.

Anticuerpo y variantes de anticuerpo

50 La divulgación proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3. En algunas realizaciones de la divulgación, el dominio de unión a antígeno no se une específicamente a otras dianas, incluyendo otros receptores HER.

55 En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H (dominio variable de cadena pesada) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L (dominio variable de cadena ligera) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.

5 En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y un V_L que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En algunas realizaciones, las HVR son HVR extendidas. En una realización específica, HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos LSGDWIH (SEQ ID NO: 48), HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos LGEISAAGGYTD (SEQ ID NO: 50), HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos ARESRVSFEEAAMDY (SEQ ID NO: 53), HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos NIATDVA (SEQ ID NO: 55), HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SASF (SEQ ID NO: 56) y HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEPEPYT (SEQ ID NO: 57).

20 En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.

30 En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y un V_L que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En algunas realizaciones, las HVR son HVR extendidas. En una realización específica, HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos LSGDWIH (SEQ ID NO: 48), HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos VGEISAAGGYTD (SEQ ID NO: 51), HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos ARESRVSFEEAAMDY (SEQ ID NO: 53), HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos NIATDVA (SEQ ID NO: 55), HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SASF (SEQ ID NO: 56) y HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEPEPYT (SEQ ID NO: 57).

45 En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45 o 46. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45 o 46.

50 En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45 o 46. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45 o 46. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45 o 46. En algunas realizaciones, las HVR son HVR extendidas.

65 En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER2 donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, 37 o 38. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER2 donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, 37 o 38.

5 En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER2 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER2 donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, 37 o 38. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER2 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, 37 o 38. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER2 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, 37 o 38. En algunas realizaciones, las HVR son HVR extendidas.

20 En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER4 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER4 donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER4 donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39.

30 En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER4 donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER4 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER4 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. En algunas realizaciones, las HVR son HVR extendidas.

40 La divulgación proporciona un anticuerpo mono específico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. En una realización de la divulgación, el anticuerpo mono específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 24. En una realización, el anticuerpo mono específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 24.

50 La divulgación proporciona un anticuerpo mono específico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. En una realización, el anticuerpo mono específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. En una realización, el anticuerpo mono específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende una, dos o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. En una realización, el anticuerpo mono específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, las HVR son HVR extendidas. En una realización específica, HVR-H comprende la secuencia de aminoácidos FTGNWIH (SEQ ID NO: 47), HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos VGEISPSGGYTD (SEQ ID NO: 49), HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos ARESRVSYEAAMDY (SEQ ID NO: 52), HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos DVSTAVA (SEQ ID NO: 78), HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SASF (SEQ ID NO: 56) y HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SYTPYTD (SEQ ID NO: 57).

65 La divulgación proporciona un anticuerpo mono específico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 29. En una realización, el anticuerpo mono-específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, 34 o 35. En una realización, el anticuerpo mono-específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, 34 o 35.

La divulgación proporciona un anticuerpo mono-específico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En una realización, el anticuerpo mono-específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, 34 o 35. En una realización, el anticuerpo mono-específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y un V_L que comprende una, dos o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, 34 o 35. En algunas realizaciones, las HVR son HVR extendidas. En una realización específica, HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos FTGDWIIH (SEQ ID NO: 62), HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos VGEISPAGAYTD (SEQ ID NO: 60), HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos AREAKVSFEAAMDY (SEQ ID NO: 61), HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos NIATDVA (SEQ ID NO: 55), HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SASF (SEQ ID NO: 56) y HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SYTPYPT (SEQ ID NO: 57).

La divulgación proporciona un anticuerpo mono-específico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. En una realización, el anticuerpo mono-específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En una realización, el anticuerpo mono-específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

La divulgación proporciona un anticuerpo mono-específico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. En una realización, el anticuerpo mono-específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En una realización, el anticuerpo mono-específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y un V_L que comprende una, dos o tres de las HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En una realización, el anticuerpo mono-específico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y un V_L que comprende las tres HVR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, las HVR son HVR extendidas. En una realización específica, HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos FSGDWIIH (SEQ ID NO: 59), HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos VGEISPAGAYTD (SEQ ID NO: 60), HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos AREAKVSFEAAMDY (SEQ ID NO: 61), HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos DLATDVA (SEQ ID NO: 54), HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SASF (SEQ ID NO: 56) y HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SYTPYPT (SEQ ID NO: 57).

En una realización de la divulgación, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 12 o 14. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 13. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al

EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

La divulgación proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER2. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno no se une específicamente a otras dianas, incluyendo otros receptores HER. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER2 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER2 donde el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, 22 o 23.

La divulgación proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER4. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno no se une específicamente a otras dianas, incluyendo otros receptores HER. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER4 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER4 donde el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

La divulgación proporciona un anticuerpo monoespecífico que se une específicamente al EGFR. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno no se une específicamente a otras dianas, incluyendo otros receptores HER. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR donde el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 3. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

La divulgación proporciona un anticuerpo monoespecífico que se une específicamente al HER3. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno no se une específicamente a otras dianas, incluyendo otros receptores HER. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, 17, 19 o 20. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o 15. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, 17, 19 o 20 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o 15.

En una realización de la divulgación el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones de la divulgación, se contempla la modificación o modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo pueden prepararse introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifican el anticuerpo, o por síntesis peptídica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones desde y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de

delección, inserción y sustitución puede realizarse para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo sujeto al mismo tiempo que se fabrica la secuencia.

5 En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia que contiene sustituciones, inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos retiene la capacidad de unirse a la diana o a las dianas originales de la secuencia de referencia. En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, un
10 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia que contiene sustituciones, inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos retiene la capacidad de unirse a la diana o a las dianas originales de la secuencia de referencia y no se une específicamente a cualquier otra diana, incluyendo los otros receptores HER. En algunas realizaciones, se han sustituido, insertado o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de referencia. En algunas realizaciones, las sustituciones, las inserciones o las deleciones se dan en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR).

En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un
20 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un
25 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97
30 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un
35 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

40 En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 y un V_L que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.
45

En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un
50 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y un V_L que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97
55 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.

En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un
60 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y un V_L que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97
65 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.

NO: 24.

La divulgación proporciona un anticuerpo monoespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y un V_L que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y un V_L que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y un V_L que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35. En una realización, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y un V_L que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.

Un alineamiento ejemplar que muestra la numeración de Kabat para el dominio variable de cadena pesada y para el dominio variable de cadena ligera de varios anticuerpos anti-HER se muestra en la Figura 33.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 donde el V_H de SEQ ID NO: 25 comprende una sustitución de aminoácidos en F29(V_H), T30(V_H), N32(V_H), V48(V_H), P52a(V_H), S53(V_H), T57(V_H), S96(V_H) o Y100(V_H), numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En una realización, el anticuerpo comprende más de una de estas sustituciones. En una realización, el anticuerpo comprende todas estas sustituciones. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 donde el V_H de SEQ ID NO: 25 comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en F29(V_H)L, T30(V_H)S, N32(V_H)D, V48(V_H)L, P52a(V_H)A, S53(V_H)A, T57(V_H)S, S96(V_H)A o Y100(V_H)F, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 donde el V_H de SEQ ID NO: 25 comprende las sustituciones de aminoácidos F29(V_H)L, T30(V_H)S, N32(V_H)D, P52a(V_H)A y S53(V_H)A y Y100(V_H)F, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

- Otro aspecto de la divulgación proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 donde el V_H de SEQ ID NO: 25 comprende una sustitución de aminoácidos en D28(V_L), V29(V_L), S30(V_L), T31(V_L), A32(V_L), V33(V_L), S50(V_L), A51(V_L), F53(V_L), S91(V_L), Y92(V_L), T93(V_L), T94(V_L) o P96(V_L), numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En una realización, el anticuerpo comprende más de una de estas sustituciones. En una realización, el anticuerpo comprende todas estas sustituciones. En una realización, el anticuerpo comprende inserciones de aminoácidos entre el aminoácido 31 y el aminoácido 32.
- En una realización de la divulgación, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 donde el V_L de SEQ ID NO: 58 comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en D28(V_L)N, V29(V_L)I, V29(V_L)L, S30(V_L)A, A32(V_L)D, Y92(V_L)E, T93(V_L)P, T94(V_L)E y P96(V_L)Y, numerados de acuerdo con el sistema de numeración Kabat. En una realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 donde el V_L de SEQ ID NO: 58 comprende las sustituciones de aminoácidos D28(V_L)N, V29(V_L)I, S30(V_L)A, A32(V_L)D, Y92(V_L)E, T93(V_L)P, T94(V_L)E y P96(V_L)Y, numerados de acuerdo con el sistema de numeración Kabat.
- En una realización de la divulgación, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, donde el V_H de SEQ ID NO: 25 comprende una sustitución de aminoácidos en F29(V_H), T30(V_H), N32(V_H), V48(V_H), P52a(V_H), S53(V_H), T57(V_H), S96(V_H) o Y100(V_H) y donde el V_L de SEQ ID NO: 58 comprende una sustitución de aminoácidos en D28(V_L), V29(V_L), S30(V_L), T31(V_L), A32(V_L), V33(V_L), S50(V_L), A51(V_L), F53(V_L), S91(V_L), Y92(V_L), T93(V_L), T94(V_L) o P96(V_L), numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En una realización, el anticuerpo comprende más de una de estas sustituciones. En una realización, el anticuerpo comprende todas estas sustituciones.
- En una realización de la divulgación, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, donde el V_H de SEQ ID NO: 25 comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en F29(V_H)L, T30(V_H)S, N32(V_H)D, V48(V_H)L, P52a(V_H)A, S53(V_H)A, T57(V_H)S, S96(V_H)A e Y100(V_H)F, el V_L de SEQ ID NO: 58 comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en D28(V_L)N, V29(V_L)I, V29(V_L)L, S30(V_L)A, A32(V_L)D, Y92(V_L)E, T93(V_L)P y P96(V_L)Y, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.
- En una realización de la divulgación, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3 donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 donde el V_H de SEQ ID NO: 25 comprende las sustituciones de aminoácidos F29(V_H)L, T30(V_H)S, N32(V_H)D, P52a(V_H)A e Y100(V_H)F, y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 donde el V_L de SEQ ID NO: 58 comprende las sustituciones de aminoácidos D28(V_L)N, V29(V_L)I, S30(V_L)A, A32(V_L)D, Y92(V_L)E, T93(V_L)P, T94(V_L)E y P96(V_L)Y, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.
- Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se llama "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este punto, un resto o un grupo de restos diana se identifican (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo otras variantes o adicionales en, o para, los sitios de sustitución. De esta manera, mientras que el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación por sí misma no está necesariamente predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo la exploración de ala o la mutagénesis al azar en el codón o en la región diana y las inmunoglobulinas expresadas se exploran para la actividad deseada.
- Las inserciones de la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en longitud desde un resto hasta polipéptidos que contienen un centenar o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de las inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

Variaciones de glucosilación

En ciertas realizaciones, un anticuerpo se altera para aumentar o disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La glucosilación de los polipéptidos es normalmente bien N-ligada u O-ligada. N-ligada se refiere a la unión de un resto carbohidrato a la cadena lateral de un resto asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De esta manera, la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación O-ligada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición o la delección de los sitios de glucosilación al anticuerpo se logran convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para los sitios de glucosilación N-ligados) se crea o se retira. La alteración también puede realizarse por la adición, la delección o la sustitución de uno o más restos serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glucosilación O-ligados).

Donde el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a la misma puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por las células de mamíferos comprenden normalmente un oligosacárido ramificado biantenarico que se une normalmente por un enlace N al Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. (1997) TIBTECH 15:26-32. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo pueden realizarse para crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

En una realización, las variantes de anticuerpos se proporcionan teniendo una estructura carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en tal anticuerpo puede ser del 1 % al 80 %, del 1 % al 65 %, del 5 % al 65 % o del 2 % al 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad media de fucosa en la cadena de azúcar en el Asn297, con respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas al Asn 297 (por ejemplo, estructuras manosa complejas, híbridas y altas) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto asparagina localizado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de los restos de la región Fc); sin embargo, el Asn297 también puede localizarse aproximadamente ± 3 aminoácidos aguas arriba o aguas debajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores en la secuencia de los anticuerpos. Tales variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. con N.º de Publicación US 2003/0157108 (Presta, L.); N.º US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de las publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: documento US 2003/0157108; documento WO 2000/61739; documento WO 2001/29246; documento US 2003/0115614; documento US 2002/0164328; documento US 2004/0093621; documento US 2004/0132140; documento US 2004/0110704; documento US 2004/0110282; documento US 2004/0109865; documento WO 2003/085119; documento WO 2003/084570; documento WO 2005/035586; documento WO 2005/035778; documento WO2005/053742; documento WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en la fucosilación de proteínas (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); Solicitud de Patente de EE.UU. N.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares knockout, tales como las células CHO knockout para el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8 (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).

Las variantes de anticuerpos se proporcionan adicionalmente con oligosacáridos bifurcados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se bifurca por GlcNAc. Tales variantes de anticuerpo pueden tener fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Los ejemplos de tales variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); Patente de EE.UU. N.º 6.602.684 (Umana et al.); y documento US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un resto galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Tales variantes de anticuerpo pueden tener función CDC mejorada. Tales variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel et al.); documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

Variantes de la región Fc

En ciertas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de esta manera una variante de la región Fc. La región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo una sustitución) en una o más

posiciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la divulgación contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, que lo hacen un candidato deseable para las aplicaciones en las cuales la vida media del anticuerpo *in vivo* es importante aunque ciertas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* pueden realizarse para confirmar la reducción/merma de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión al receptor Fc (FcR) pueden realizarse para asegurar que el anticuerpo carece de unión al FcγR (por lo tanto igualmente carecen de actividad ADCC), pero retienen la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar ADCC, las células NK, expresan solamente el FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Los ejemplos no limitantes de los ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe en la Patente de EE.UU. n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 82:1499-1502 (1985); documento 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De forma alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y los linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquel desvelado en Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 95:652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unir C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en el documento WO 2006/029879 y en el documento WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También pueden realizarse determinaciones de unión a FcRn y aclarado/vida media *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12): 1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más restos 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de la región Fc (Patente de EE.UU. n.º 6.737.056). Tales mutantes de Fc con sustituciones en dos o más posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante Fc llamado "DANA" con sustitución de los restos 265 y 297 por alanina (Patente de EE.UU. n.º 7.332.581).

Se describen ciertas variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida al FcRs (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. n.º 6.737.056; documento WO 2004/056312 y Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpos comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos con ADCC mejorada, por ejemplo sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de los restos).

En algunas realizaciones, las alteraciones se realizan en la región Fc que dan como resultado la unión a C1q y/o la Citotoxicidad Dependiente del Complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o bien disminuidas), por ejemplo como se describe en la Patente de EE.UU. n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 e Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Los anticuerpos con vidas medias aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)) se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Aquellos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en los mismos que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Tales variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los restos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, la sustitución del resto de la región Fc 434 (Patente de EE.UU. n.º 7.371.826).

Véase también Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); Patente de EE.UU. n.º 5.648.260; Patente de EE.UU. n.º 5.624.821; y documento WO 94/29351 que tratan otros ejemplos de variantes de la región Fc.

Variantes de anticuerpo de cisteína por ingeniería

En ciertas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos con cisteína por ingeniería, por ejemplo, "tioMAbs", en los que uno o más restos de un anticuerpo se sustituyen por restos cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se dan en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo aquellos restos con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan de esta manera en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármacos o restos de fármacos conectores, para crear un inmunocombinado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, uno cualquiera o más de los siguientes restos pueden sustituirse por cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena

ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la cadena pesada de la región Fc. Los anticuerpos con cisteína por ingeniería pueden generarse como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N.º 7.521.541.

5 Derivados de anticuerpos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y que son fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen pero no se limitan a polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o sin ramificar. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, pueden ser la misma o diferentes moléculas. En general, el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización puede determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o las funciones particulares del anticuerpo a mejorarse, si el derivado del anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y de un resto no proteico que puede calentarse selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, longitudes de onda que no calientan a las células ordinarias, pero que calientan el resto no proteico a una temperatura en la que las células proximales al anticuerpo no proteico se mueren. Véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Se proporcionan otras variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero las alteraciones de FR también se contemplan. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Se proporcionan más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares", en la Tabla 3, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en un anticuerpo de interés y los productos explorados, por ejemplo, para una actividad deseada, tal como unión a antígeno mejorada, inmunogenicidad disminuida, ADCC o CDC mejoradas, etc.

TABLA 1

Resto original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr

Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Las modificaciones de las propiedades biológicas de un anticuerpo pueden lograrse seleccionando sustituciones que afectan (a) a la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o en hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda edición, páginas 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

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

(2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

De forma alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basados en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

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

(2) hidrófilos neutras: Cys, Ser, Tyr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

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

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas conllevarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Tales restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o en los sitios que queden (no conservados).

Un tipo de variante sustitucional implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) con respecto al anticuerpo parental a partir del que se generan. Una variante sustitucional ejemplar es un anticuerpo de afinidad madura, que puede generarse convenientemente usando técnicas de maduración de afinidad basadas en visualización de fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de esta manera se visualizan a partir de partículas filamentosas de fagos como fusiones a al menos parte de una proteína de la cubierta del fago (por ejemplo, el producto III génico del M13) empaquetado con cada partícula. Las variantes de visualización de fago se exploran después para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Para identificar sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, puede realizarse mutagénesis de barrido (por ejemplo barrido de alanina) para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. De forma alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales restos de contacto y restos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con técnicas conocidas en la materia, incluyendo aquellas elaboradas en el presente documento. Una vez que tales variantes se genera, el panel de variantes se somete a la exploración usando técnicas conocidas en la materia, incluyendo aquellas descritas en el presente documento, y las variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para el desarrollo adicional.

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

Inmunconjugados

La divulgación también proporciona inmunconjugados (intercambiamente denominados "conjugados anticuerpo-fármaco" o "ADC") que comprenden un anticuerpo conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina proteica, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o un isótopo radiactivo, tal como At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu (es decir, un radiocójugado).

Los inmunocombinados se han usado para el transporte local de agentes citotóxicos, es decir, fármacos que matan o inhiben el crecimiento o la proliferación de las células, en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) *Curr. Opin. in Pharmacology* 5:543-549; Wu et al (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) *ibid* 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26:151-172; Pat. de EE.UU. N.º 4.975.278). Los inmunocombinados permiten el transporte marcado de un resto de fármaco a un tumor, y la acumulación intracelular del mismo, donde la administración sistémica de los fármacos sin conjugar puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células normales así como las células tumorales que tratan de eliminarse (Baldwin et al., *Lancet* (Mar. 15, 1986) pp. 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (A. Pinchera et al., eds) pp. 475-506. Tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales se han informado como útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland et al., (1986) arriba). Las toxinas usadas en los combinados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como la toxina diftérica, toxinas vegetales tales como el ricino, toxinas moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler et al (2000) *J. Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93:8618-8623), y calicheamicina (Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos por mecanismos que incluyen la unión a tubulina, la unión al ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se combinan con grandes anticuerpos o ligandos de receptores de proteínas.

Se ha demostrado que el trastuzumab-DM1 (o T-DM1) es eficiente en modelos sensibles a trastuzumab e insensibles a trastuzumab de cáncer que sobreexpresa HER2. (Documento US 7097840). ZEVALIN® (tiuxetano de ibritumomab, Biogen/Idec) es un combinado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos normales y malignos y un radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido o un conector-quelante de tiourea (Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra el linfoma de linfocitos B no de Hodgkin (NHL), la administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de pacientes. MYLOTARG™ (ozogamicina de gemtuzumab, Wyeth Pharmaceuticals), un combinado anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo huCD33 unido a calicheamicina, se aprobó en 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda por inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; Patente de EE.UU. N.º 4970198; N.º 5079233; N.º 5585089; N.º 5606040; N.º 5693762; N.º 5739116; N.º 5767285; N.º 5773001). La mertansina de cantuzumab (Immunogen, Inc.), un combinado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 unido a través del conector disulfuro SPP al resto del fármaco maitansinoide, DM1, está avanzando en pruebas de Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como cáncer de colon, pancreático, gástrico y otros cánceres. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un combinado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal del antígeno de membrana específico anti-próstata (PSMA) unido al resto fármaco maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se combinaron en anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos para CD30 en malignidades hematológicas) (Doronina et al (2003) *Nature Biotechnol.* 21(7):778-784) y están en desarrollo terapéutico.

En ciertas realizaciones, un inmunocombinado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunocombinados se describen en el presente documento (por ejemplo, anteriormente). Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricino, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcuma, crotona, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre, 1993. Varios radionucleidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁹⁶Re. Los combinados del anticuerpo y del agente citotóxico se realizan usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados funcionales de imidoésteres (tales como de adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricino puede prepararse como se describe en Vietta et al., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

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

5 **Maitansina y maitansinoides**

En algunas realizaciones, el inmunconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) conjugados a una o más moléculas de maitansinoide.

10 Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del este africano *Maytenus serrata* (Patente de EE.UU. N.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de EE.UU. N.º 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y los análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N.º 4.137.230; N.º 4.248.870; N.º 4.256.746; N.º 4.260.608; N.º 4.265.814; N.º 4.294.757; N.º 4.307.016; N.º 4.308.268; N.º 4.308.269; N.º 4.309.428; N.º 4.313.946; N.º 4.315.929; N.º 4.317.821; N.º 4.322.348; N.º 4.331.598; N.º 4.361.650; N.º 4.364.866; N.º 4.424.219; N.º 4.450.254; N.º 4.362.663; y N.º 4.371.533.

20 Los restos de fármaco maitansinoide son restos de fármacos atractivos en los conjugados de anticuerpo y fármaco porque son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivatización de los productos de fermentación, (ii) susceptibles a derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación a través de los conectores distintos a disulfuro con los anticuerpos, (iii) estables en el plasma y (iv) eficaces contra diversas líneas celulares tumorales.

25 Los inmunconjugados que contienen maitansinoides, los métodos para fabricar los mismos y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N.º 5.208.020 y N.º 5.416.064 y en la Patente europea N.º EP 0 425 235 B1, las divulgaciones de las cuales por la presente se incorporan expresamente por referencia. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93:8618-8623 (1996) describían inmunconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. El conjugado se encontró ser altamente citotóxico contra las células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) describe inmunconjugados en los cuales un maitansinoide se conjugó a través de un conector disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que une el oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3 x 10⁵ antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco logró un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró menor citotoxicidad sistémica en ratones.

40 Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan uniendo químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo ni de la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 5.208.020 (la divulgación de la cual por la presente se incorpora expresamente por referencia). Una media de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo han demostrado eficiencia potenciando la citotoxicidad de las células diana sin afectar negativamente a la función o a la solubilidad del anticuerpo, aunque incluso una molécula de toxina/anticuerpo se esperaría que potenciase la citotoxicidad sobre el uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse a partir de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N.º 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no de patentes a las que se ha hecho referencia anteriormente en el presente documento. Los maitansinoides preferidos son el maitansinol y los análogos del maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

55 Hay muchos grupos conectores conocidos en la técnica para fabricar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, aquellos desvelados en la Patente de EE.UU. N.º 5.208.020 o la Patente EP 0 425 235 B1, Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) y la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 10/960.602, enviada el 8 de octubre, 2004, las divulgaciones de las cuales por la presente se incorporan expresamente por referencia. Los conjugados anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente conector SMCC pueden prepararse como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 10/960.602, enviada el 8 de octubre, 2004. Los grupos conectores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles peptidasa o grupos lábiles esterasa, como se desvela en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose los grupos disulfuro y tioéter. Los grupos conectores adicionales se describen y se ejemplifican en el presente documento.

65 Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide pueden fabricarse usando diversos agentes de acoplamiento proteicos bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como

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

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

Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, el inmunoc conjugado comprende un anticuerpo conjugado a las dolastatinas o a los análogos peptídicos y los derivados de la dolostatina, las auristatinas (Patente de EE.UU. N.º 5635483; N.º 5780588). Las dolastatinas y las auristatinas han demostrado interferir con las dinámicas de los microtúbulos, la hidrólisis del GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El resto de fármaco de dolostatina o de auristatina puede unirse al anticuerpo a través del N terminal (amino) o del C terminal (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

Las realizaciones de auristatina ejemplares incluyen los restos DE y DF de fármaco monometilauristatina unidos al N-terminal, desvelados en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Ser. EE.UU. N.º 10/983.340, enviado el 5 de noviembre de 2004, la divulgación del cual se incorpora expresamente por referencia en su totalidad.

Normalmente, los restos de fármaco basados en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que se conoce bien en el campo de la química peptídica. Los restos de fármaco de auristatina/dolostatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de: documento US 5635483; documento US 5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; y Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863. Véase también Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Ser. EE.UU. N.º 10/983,340, enviado el 5 de noviembre, 2004, por la presente incorporado por referencia en su totalidad (que desvela, por ejemplo, conectores y métodos para preparar compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados a los conectores).

Calicheamicina

En otras realizaciones, el inmunoc conjugado comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos de la calicheamicina es capaz de producir roturas en el ADN de doble hélice en concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la calicheamicina, véanse las patentes de EE.UU. N.º 5.712.374, N.º 5.714.586, N.º 5.739.116, N.º 5.767.285, N.º 5.770.701, N.º 5.770.710, N.º 5.773.001, N.º 5.877.296 (todas de la American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la calicheamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a γ 1I, α 2I, α 3I, N-acetil- γ 1I, PSAG y θ 11 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE.UU. de la American Cyanamid Company anteriormente mencionadas). Otro fármaco anti-tumoral al que puede conjugarse el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la calicheamicina como el QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la toma celular de estos agentes a través de la internalización mediada o anticuerpo potencia enormemente sus efectos de citotoxicidad.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse a los anticuerpos incluyen BCNU, estreptozaocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las patentes de EE.UU. n.º 5.053.394, n.º 5.770.710, así como las esperamicinas (patente de EE.UU. n.º 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen la cadena A diftérica, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricino, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina,

fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre, 1993.

La presente divulgación contempla adicionalmente un inmunoc conjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto sin actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; ADNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Diversos radionucleidos está disponible para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} y los isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios de centellografía, por ejemplo Tc^{99m} o I^{123} , o una etiqueta de espín para la formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, irm), tales como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Las radio-etiquetas u otras pueden incorporarse en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Las etiquetas tales como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} pueden unirse a través de un resto cisteína en el péptido. El itrio-90 puede unirse a través de un resto lisina. El método IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describen otros métodos en detalle.

Los conjugados del anticuerpo y del agente citotóxico pueden realizarse usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados funcionales de imidoésteres (tales como de adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricino puede prepararse como se describe en Vietta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un conector lábil ácido, un conector sensible a peptidasa, un conector fotolábil, un conector de dimetilo o un conector que contenga disulfuro (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); Patente de EE.UU. N.º 5.208.020).

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

Preparación de conjugados de fármacos y anticuerpos

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



El conector puede componerse por uno o más componentes conectores. Los componentes conectores ejemplares incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("alaph"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), 4-(2-piridilditio) pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC") y (4-yodo-acetil) aminobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB"). Los componentes conectores adicionales se conocen en la técnica y algunos se describen en el presente documento. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Ser. EE.UU. N.º 10/983,340, enviado el 5 de noviembre, 2004, los contenidos del cual por la presente se incorporan por referencia en su totalidad.

- En algunas realizaciones, el conector puede comprender restos de aminoácidos. Los componentes conectores de aminoácidos ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácido que comprenden un componente conector de aminoácido incluyen aquellos de origen natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Los componentes conectores de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad por la escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada al tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.
- Los grupos nucleófilos en los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina N-terminales, (ii) grupos amina de cadenas laterales, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) hidroxilo o grupos amino de azúcares donde el anticuerpo se glucosila. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en los restos de conector y los reactivos conectores que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y de bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, por ejemplo, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos conectores a través del tratamiento con un agente reductor tal como el DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará de esta manera, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Los grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) que da como resultado la conversión de una amina en un tiol. Los grupos reactivos tiol pueden introducirse en el anticuerpo (o el fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos del aminoácido cisteína no nativos).
- Los conjugados de fármacos y anticuerpo también pueden producirse por la modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo o el fármaco conector. Los azúcares de los anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos conectores o de los restos de fármaco. Los grupos bases de Schiff imina resultantes pueden formar una unión estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos borohidruro para formar uniones amina estables. En una realización, la reacción de la porción carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o bien con meta-peryodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen restos serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-peryodato sódico, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento US 5362852). Tal aldehído puede hacerse reaccionar con un resto de fármaco o con un nucleófilo conector.
- Igualmente, los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y grupos arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos conectores y reactivos conectores que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y de bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida.
- De forma alternativa, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico pueden producirse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado bien adyacentes entre sí o bien separadas por una región que codifica un péptido de unión que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.
- Todavía en otra realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilizarlo en el pre-marcado como diana en tumores en los que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la retirada del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de aclarado y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).
- Métodos y composiciones recombinantes**
- Los anticuerpos pueden producirse usando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo como se describe en la Patente de EE.UU. N.º 4.816.567. En una realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-HER descrito en el presente documento. Tal ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligeras y/o pesadas del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden tales ácidos nucleicos. En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende tal ácido nucleico. En una realización tal, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que

comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En una realización, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En una realización, se proporciona un método para fabricar un anticuerpo anti-HER, en el que el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o el medio de cultivo de la célula hospedadora).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-HER, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para la clonación adicional y/o la expresión en una célula hospedadora. Tal ácido nucleico puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo).

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o para expresar vectores que codifican anticuerpos incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glucosilación y la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 5.648.237, N.º 5.789.199 y N.º 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente. Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores de clonación o de expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y de levaduras cuyas rutas de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas que pueden usarse junto con células de insectos, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como hospedadores. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 5.959.177, N.º 6.040.498, N.º 6.420.548, N.º 7.125.978 y N.º 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIESTM para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados también pueden usarse como hospedadores. Por ejemplo, pueden ser útiles las líneas celulares de mamíferos que se adaptan a crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 como se describe, por ejemplo, en Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)), células de ratón de hámster bebé (BHK); células de sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (HepG2); tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo las células DHFR-CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77:4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares hospedadoras de mamíferos adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Usos terapéuticos

Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo descritos en el presente documento pueden usarse para el tratamiento del cáncer, incluyendo tumores pre-cancerosos, no metastásicos, metastásicos y cancerosos (por ejemplo, cáncer de fase temprana), o para el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer, por ejemplo, cáncer de mama. Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo también pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades no malignas, tales como trastornos neurodegenerativos, trastornos psiquiátricos o enfermedades autoinmunes.

El término cáncer abarca una colección de trastornos proliferativos, que incluyen pero no se limitan a crecimientos pre-cancerosos, tumores benignos y tumores malignos. Los tumores benignos se mantienen localizados en el sitio de origen y no tienen la capacidad de infiltrar, invadir o metastasizar en sitios distantes. Los tumores malignos invadirán y dañarán otros tejidos a su alrededor. También pueden ganar la capacidad de partir desde donde empezaron y esparcirse por otras partes del cuerpo (metastasizar), normalmente a través del torrente sanguíneo o a

través del sistema linfático donde se localizan los nodos linfáticos). Los tumores primarios se clasifican por el tipo de tejido del que surgen; los tumores metastásicos se clasifican por el tipo de tejido del que derivan las células cancerígenas. Con el tiempo, las células de un tumor maligno se vuelven más anormales y se parecen menos a las células normales. Este cambio en la apariencia de las células cancerígenas se llama el grado del tumor y las células cancerígenas se describen como estando bien diferenciadas, moderadamente diferenciadas, poco diferenciadas o indiferenciadas. Las células bien diferenciadas son de apariencia bastante normal y se asemejan a las células normales de las que se originaron. Las células indiferenciadas son células que se han vuelto tan anormales que ya no es posible determinar el origen de las células.

El tumor puede ser un tumor sólido o un tumor de tejido blando o no sólido. Los ejemplos de tumores de tejido blando incluyen leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda en adultos, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B maduros, leucemia linfocítica crónica, leucemia polilinfocítica o leucemia de células pilosas) o linfoma (por ejemplo, linfoma no de Hodgkin, linfoma de linfocitos T cutáneos o enfermedad de Hodgkin). Un tumor sólido incluye cualquier cáncer de tejidos corporales distintos a la sangre, la médula ósea o el sistema linfático. Los tumores sólidos pueden separarse adicionalmente en aquellos de origen de células epiteliales y aquellos de origen de células no epiteliales. Los ejemplos de los tumores sólidos de células epiteliales incluyen tumores del tracto gastrointestinal, el colon, la mama, la próstata, el pulmón, el riñón, el hígado, el páncreas, el ovario, la cabeza y el cuello, la cavidad oral, el estómago, el duodeno, el intestino delgado, el intestino grueso, el ano, la vesícula biliar, los labios, la nasofaringe, la piel, el útero, los órganos genitales masculinos, los órganos urinarios, la vejiga y la piel (incluyendo el melanoma). Los tumores sólidos de origen no epitelial incluyen sarcomas, tumores cerebrales y tumores óseos.

Los cánceres epiteliales evolucionan generalmente a partir de un tumor benigno hacia una fase preinvasiva (por ejemplo, carcinoma *in situ*), hacia un cáncer maligno, que ha penetrado la membrana basal y ha invadido el estroma subepitelial.

En una realización, los anticuerpos multiespecíficos se unen específicamente al EGFR y al menos a un otro receptor HER, tal como HER2 o HER3 o HER4, y encuentran utilidad en la prevención y/o el tratamiento de los tumores sólidos, en particular tumores colorrectales, de pulmón (tales como cáncer de pulmón microcítico y carcinoma de células escamosas), de cabeza y cuello, de ovarios, de piel, pancreático y/o de mama.

Los anticuerpos multiespecíficos también encuentran uso reduciendo o previniendo la resistencia al tratamiento que marca como diana la ruta de HER. Una limitación significativa usando los tratamientos que marcan como diana la ruta de HER es la resistencia que muestran muchos pacientes de cáncer a los efectos terapéuticos del tratamiento. Algunos pacientes de cáncer no muestran respuesta al tratamiento que marca como diana la ruta de HER. Otros pacientes de cáncer pueden mostrar una respuesta inicial pero después volverse resistentes al tratamiento. Un cáncer es resistente al tratamiento si el cáncer ha avanzado recibiendo el tratamiento (refractario) o si el cáncer ha avanzado en los 12 meses después de completar un régimen de tratamiento (relapso).

En una realización, el tratamiento que marca como diana la ruta de HER comprende el tratamiento con anticuerpos que marcan como diana la ruta de HER (por ejemplo, anticuerpos EGFR, anticuerpos HER2, anticuerpos HER3 y/o anticuerpos HER4). En otra realización, el tratamiento que marca como diana la ruta de HER comprende el tratamiento con un agente quimioterapéutico.

45 **Dosificaciones y formulaciones**

Las composiciones de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpo en el presente documento se formularán, se dosificarán y se administrarán de forma coherente con la buena práctica médica. Los factores para la consideración en este contexto incluyen el trastorno particular a tratarse, el mamífero particular a tratarse, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de transporte del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo a administrarse estará regida por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, aliviar o tratar un cáncer. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo no necesita estar, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el cáncer o un riesgo de desarrollar cáncer. La cantidad eficaz de otros agentes tales depende de la cantidad de anticuerpo o de fragmento de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con rutas de administración como se usa anteriormente en el presente documento o de aproximadamente el 1 al 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora. Generalmente, el alivio o el tratamiento de un cáncer implica la disminución de uno o más síntomas o problemas médicos asociados al cáncer. La cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede cumplir uno o una combinación de lo siguiente: reducir (al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 100 % o más) el número de células cancerígenas, reducir o inhibir el tamaño del tumor o la carga tumoral; inhibir (es decir, disminuir en algún grado y/o parar) la infiltración de las células cancerígenas en los órganos periféricos; reducir la secreción hormonal en el caso de los adenomas; reducir la densidad vascular; inhibir la metástasis del tumor; reducir o inhibir el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto grado uno o más de los síntomas asociados al cáncer. En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de

anticuerpo se usan para prevenir la aparición o la reaparición del cáncer en el sujeto.

En una realización, el tratamiento puede usarse para aumentar la duración de la supervivencia de un paciente humano susceptible a o diagnosticado con un cáncer. La duración de la supervivencia se define como el tiempo desde la primera administración del fármaco hasta la muerte. La duración de la supervivencia también puede medirse por la relación de riesgo (HR) estratificada del grupo de tratamiento frente al grupo control, que representa el riesgo de muerte de un paciente durante el tratamiento.

Todavía en otra realización, el tratamiento aumenta significativamente la tasa de respuesta en un grupo de pacientes humanos susceptibles a o diagnosticados con un cáncer quienes se tratan con diversas terapias anti-cáncer. La tasa de respuesta se define como el porcentaje de pacientes tratados quienes respondieron al tratamiento. En un aspecto, el tratamiento de combinación de la invención que usa un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo y cirugía, terapia de radiación o uno o más agentes quimioterapéuticos aumenta significativamente la tasa de respuesta en el grupo de pacientes tratados en comparación con el grupo tratado con cirugía, terapia de radiación o quimioterapia solos, teniendo el aumento un p-valor de Chi cuadrado de menos de 0,005.

Las mediciones adicionales de la eficiencia terapéutica en el tratamiento de los cánceres se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. con N.º de Publicación 20050186208.

Las formulaciones terapéuticas se preparan usando métodos convencionales conocidos en la técnica mezclando el ingrediente activo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos fisiológicamente aceptables, excipientes o estabilizantes opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences (edición 20a.sup.), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.). Los vehículos aceptables, incluyen solución salina, o tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina serosa, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparaginas, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o PEG.

Opcionalmente pero preferentemente, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, preferentemente cloruro sódico y preferentemente a concentraciones aproximadamente fisiológicas.

Opcionalmente, las formulaciones pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones los intervalos de concentración de conservante varían del 0,1 al 2,0 %, normalmente en v/v. Los conservantes adecuados incluyen aquellos conocidos en la materia farmacéutica. Alcohol bencílico, fenol, m-cresol, metilparabeno y propilparabeno son conservantes preferidos. Opcionalmente, las formulaciones pueden incluir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable a una concentración del 0,005 al 0,02 %.

La formulación del presente documento puede contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular a tratarse, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten adversamente entre sí. Tales moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin destinado.

Los ingredientes activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, una microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y una microcápsula de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de transporte de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, arriba.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de EE.UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glucólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glucólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros tales como el acetato de etilen-vinilo y el ácido láctico-ácido glucólico permiten la liberación de las moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados se mantienen en el cuerpo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden concebirse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es un enlace S--S intermolecular a través de intercambio tio-disulfuro, puede lograrse la estabilización modificando restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo descritos en el presente documento se administran a un sujeto humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. La administración local puede desearse particularmente si se asocian efectos secundarios extensivos o toxicidad al antagonismo de HER (por ejemplo, EGFR, HER2, HER3, HER4 etc.). También puede usarse una estrategia *ex vivo* para aplicaciones terapéuticas. Las estrategias *ex vivo* implican transfectar o transducir células obtenidas del sujeto con un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Las células transfectadas o transducidas se devuelven al sujeto. Las células pueden ser cualquiera de un amplio intervalo de tipos que incluye, sin limitación, células hematopoyéticas (por ejemplo, células de la médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, linfocitos T o linfocitos B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células musculares.

En un ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se administra localmente, por ejemplo, por inyecciones directas, donde el trastorno o la localización del tumor lo permita, y las inyecciones pueden repetirse periódicamente. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo puede transportarse también sistémicamente al sujeto o directamente a las células tumorales, por ejemplo a un tumor o a un lecho tumoral después de la escisión quirúrgica del tumor, para prevenir o reducir la recurrencia local o la metástasis.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada del anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratarse, el tipo de anticuerpo, la gravedad y el avance de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico que atiende. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 20 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg-15 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación inicial candidata para la administración al paciente, si, por ejemplo, es una o más administraciones separadas o por infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se sostendría generalmente hasta que se dé una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. De esta manera, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg o 20 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) pueden administrarse al paciente. Tales dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas (por ejemplo, de tal manera que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis inicial de carga mayor, seguido de una o más dosis menores. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento más débil de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia puede monitorizarse fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Terapia de combinación

Un anticuerpo desvelado en el presente documento puede combinarse en una formulación de combinación, o un régimen de dosificación como una terapia de combinación, con un segundo compuesto que tenga propiedades anti-cáncer. El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o el régimen de dosificación pueden tener actividades complementarias al anticuerpo de la combinación de tal manera que no se afecten adversamente entre sí. En una realización, el anticuerpo multiespecífico se usa en combinación con otro anticuerpo anti-HER, tal como HERCEPTIN®, pertuzumab y/o cetuximab. Los anticuerpos también pueden usarse en combinación con terapia de radiación.

El segundo compuesto puede ser un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citocina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente anti-hormonal y/o un cardioprotector. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para los fines destinados. Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de la divulgación puede tener también una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico tal como un inhibidor de la formación de tubulina, un inhibidor de la topoisomerasa, un intercalador de ADN o un agente de unión al ADN.

Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración de un agente anticáncer identificado de acuerdo con la presente divulgación. La terapia de combinación puede administrarse como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación puede administrarse en dos o más administraciones. La administración combinada incluye la coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que hay un periodo de tiempo en la que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Los ejemplos de tal terapia de combinación incluyen combinaciones con agentes quimioterapéuticos tales como erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE®, Millenium Pharm.), fulvestrant

(FASLODEX®, Astra-Zeneca), suturent (SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), oxaliplatino (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, Rapamicina (Sirolimus, RAPAMUME®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, GlaxoSmithKline), lonafarnib (SCH 66336), sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs.) y gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; antifolato antineoplásico tal como pemetrexed (ALIMTA® Eli Lilly), aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; caliestatina; CCT-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, marcelomicina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediína, calicheamicina, calicheamicina gamma11 y calicheamicina omega11; dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediína relacionados con cromoproteínas, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorubicina; cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, streptonigrina, streptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofuro, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenos del ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinán; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK® complejo polisacárido (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2'-trichlorotrietilamina; tricostenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomicina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ formulación de nanopartículas de albúmina de paclitaxel libres de cremóforo (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; tenipósido; edatraxato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Tal terapia de combinación también incluye: (i) agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas en los tumores tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; (ii) inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGACE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; (iii) anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina, así como troxacitabano (un análogo 1,3-dioxolano del nucleósido citosina); (iv) inhibidores de la proteína quinasa; (v) inhibidores de la lípido quinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; (vii) ribozimas tales como el inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; (viii) vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; ; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agentes anti-angiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y (x) sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

La preparación y las programaciones de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como se determina empíricamente por el médico experto en la materia. La preparación y las programaciones de dosificación para tal quimioterapia se describen también en

Chemotherapy Service, (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y demostrar ser "sinérgica", es decir, el efecto logrado cuando los ingredientes activos se usan juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan de usar los compuestos separadamente. Un efecto sinérgico puede obtenerse cuando los ingredientes activos: (1) se co-formulan y se administran o se transportan simultáneamente en una formulación de dosificación combinada unitaria; (2) se transportan por alternación o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se transportan en una terapia de alternación, puede obtenerse un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o se envían secuencialmente, por ejemplo por inyecciones diferentes en jeringas separadas. En general, durante una terapia de alternación, se administra secuencialmente una dosificación eficaz de cada ingrediente activo, es decir, en serie, mientras que en una terapia de combinación, las dosificaciones eficaces de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

Artículos de fabricación y kits

Otra realización de la divulgación es un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los cánceres. El artículo de fabricación comprende un envase y una lámina o un paquete insertado en o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los envases pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor mantiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que se puede perforar con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo multiespecífico o un fragmento de anticuerpo de la invención. La etiqueta o el paquete insertado indican que la composición se usa para tratar la afección particular. La etiqueta o el paquete insertado comprenderán adicionalmente instrucciones para administrar la composición de anticuerpo al paciente. Los artículos de fabricación y los kits que comprenden las terapias combinatorias descritas en el presente documento también se contemplan.

Paquete insertado se refiere a instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de los productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias que conciernen al uso de tales productos terapéuticos. En una realización, el paquete insertado indica que la composición se usa para tratar un tumor sólido, tal como, por ejemplo, cáncer colorrectal, de pulmón y/o de mama.

Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir adicionalmente otros materiales deseables a partir de un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También se proporcionan kits que son útiles para diversos fines, por ejemplo, para la purificación o la inmunoprecipitación de receptores HER de las células. Para el aislamiento y la purificación del EGFR y/o del HER2 y/o del HER3 y/o del HER4, el kit puede contener un anticuerpo EGFR/HER2 y/o EGFR/HER3 y/o EGFR/HER4 acoplado a perlas (por ejemplo perlas SEPHAROSE®). Pueden proporcionarse kits que contienen los anticuerpos para la detección y la cuantificación del receptor HER deseado *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o en una transferencia Western. Como con el artículo de fabricación, el kit comprende un envase y una etiqueta o un paquete insertado en o asociado al envase. El envase mantiene una composición que comprende al menos un anticuerpo multiespecífico o un fragmento de anticuerpo de la invención. Pueden incluirse envases adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y tampones o anticuerpos de control. La etiqueta o el paquete insertados pueden proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para el uso destinado *in vitro* o diagnóstico.

La descripción escrita anterior se considera que es suficiente para permitir que un experto en la materia practique la invención. Los siguientes Ejemplos se ofrecen solamente para fines ilustrativos, y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior.

Los reactivos disponibles en el mercado a los que se hace referencia en los Ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante salvo que se indique de otra manera. La fuente de aquellas células identificadas en los siguientes Ejemplos, y a lo largo de toda la memoria descriptiva, por números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA. Salvo que se observe de otra manera, la presente invención usa procedimientos convencionales de tecnología de ADN recombinante, tales como aquellos descritos anteriormente en el presente documento y en los siguientes libros de texto: Sambrook et al., arriba; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y., 1989); Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Inc.: N.Y., 1990); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988); Gait, *Oligonucleotide Synthesis* (IRL Press: Oxford, 1984); Freshney, *Animal Cell Culture*, 1987; Coligan et al., *Current Protocols in Immunology*, 1991.

EJEMPLOSEjemplo 15 Aislamiento y caracterización de anticuerpos que unen el EGFR humanoMateriales

10 Las enzimas y el fago ayudante M13-KO7 se obtuvieron de New England Biolabs. *E. coli* XL1-Blue era de Stratagene. La albúmina de suero bovino (BSA), la ovoalbúmina y el Tween 20 se obtuvieron de Sigma. La neutravidina, la caseína y el Superblock se obtuvieron de Pierce. El anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) se obtuvo de Amersham Pharmacia. Las inmunoplasmas Maxisorp se obtuvieron de NUNC (Roskilde, Dinamarca). El sustrato tetrametilbencidina (TMB) se obtuvo de Kirkegaard and Perry Laboratories (Gaithersburgo, MD).

15 Construcción de la biblioteca

20 Las bibliotecas de anticuerpos de fagos visualizados se generaron basándose en una región marco humana a partir de 4D5 humanizado (h4D5, trastuzumab), donde la diversidad de la cadena lateral y de la longitud se incorporaron en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2, CDR3) de la cadena pesada en la primera biblioteca (Biblioteca 1) y en las CDR de la cadena pesada y en el CDR3 de la cadena ligera en la segunda biblioteca (Biblioteca 2) centrándose todavía en la diversificación en la cadena pesada como se describe (Lee et al., J. Mol. Biol, 340: 1073-1093 (2004)). Las bibliotecas se construyeron como se describe (Lee et al., J. Mol. Biol, 340: 1073-1093 (2004)) excepto que los oligonucleótidos degenerados usados se modificaron modestamente.

25 Clasificación de las dos bibliotecas.

30 La Biblioteca 1 y la Biblioteca 2 se sometieron directamente a selección por unión a la diana (hEGFR-ECD-Fc (dominio extracelular del EGFR humano fusionado a una región Fc de la IgG1 humana) y EGFRvIII-Fc). La proteína EGFRvIII-Fc es una variante del EGFR en el que falta la mayoría del dominio II (E1-P353 (sin incluir el péptido señal)) fusionada a la región Fc de la hlgG1. Véase Kuan, C-T, et al., Endocrine-Related Canc. 8: 83-96 (2001); Bigner, S H, et al., Cancer Research, 50: 8017-8022 (1990). Unas placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos se recubrieron con 100 µl/pocillo del antígeno diana (hEGFR-ECD-Fc, EGFRvIII-Fc) (5 µg/ml) en PBS (tampón Carbonato Sódico, 0,05 M, pH 9,6) a 4 °C durante toda la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se bloquearon con agentes bloqueantes alternativos. Se incubaron soluciones de fago de 10¹³ fagos/ml (3-5 OD/ml) con los antígenos recubiertos durante 18 h en la primera ronda de selección. La entrada de fagos se disminuyó en cada ronda de selección como sigue: 1ª ronda 3-5 O.D/ml, 2ª ronda 3 O.D/ml, 3ª ronda 0,5-1 O.D/ml y 4ª ronda entrada de 0,1-0,5 O.D/ml. El fago diluido se incubó durante 30 minutos en hielo. Se añadió 1 µM de una proteína de Fusión-Fc al fago bloqueado de la 3ª ronda para retirar los agentes de unión a Fc. Después de la incubación de las soluciones de fagos (100 µl/pocillo para 8 pocillos recubiertos con antígeno diana y 2 pocillos sin recubrir) en las inmunoplasmas para permitir la unión al antígeno inmovilizado (durante toda la noche para la 1ª ronda, 2 horas para el resto de rondas), las inmunoplasmas se lavaron al menos diez veces continuamente con PBS y Tween 20 al 0,05 %. El fago unido se eluyó con 100 µl/pocillo de HCl 100 mM a temperatura ambiente durante 20 minutos. El fago eluido (a partir de los pocillos recubiertos) y el fago de fondo (de los pocillos sin recubrir) se neutralizaron añadiendo un volumen 1/10 de Tris 1 M a pH 11,0 y BSA hasta un 0,1 % final. La recuperación de fagos por pocillo de la inmunoplasma recubierta de antígenos se calculó y se comparó con aquella de un pocillo bloqueado sin antígeno recuperado para estudiar el enriquecimiento de los clones de fagos que muestran Fab que se unen específicamente al antígeno diana. Los fagos eluidos se amplificaron en *E. coli* y se usaron para rondas adicionales de selección.

50 Caracterización de alto rendimiento de los clones de unión a hEGFR

55 Se seleccionaron clones al azar de la ronda 4 para la exploración y se ensayaron usando ELISA de fagos en el cual la unión a la diana y a anti-gD se comparó con la unión a proteínas no relevantes (BSA, HER2, un anticuerpo anti-EGFR, trastuzumab).

60 Se recubrieron inmunoplasmas con un formato de 384 pocillos con 1 µg/ml de diana, anti-gD y proteínas no relevantes a 4 °C durante toda la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas y se bloquearon 1 h con BSA al 1 % en PBS. Los clones de fagémidos en *E. coli* XL1-Blue se hicieron crecer en 150 µl de caldo 2YT suplementado con carbenicilina y el fago ayudante M13-KO7; los cultivos se hicieron crecer con agitación durante toda la noche a 37 °C en un formato de 96 pocillos. Los sobrenadantes del cultivo que contenían fagos se diluyeron cinco veces en PBST (PBS con Tween 20 al 0,05 % y BSA al 0,5 % (p/p)). Se añadieron 30 µl de mezcla a cada cuadrante de la placa recubierta de 384 pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con PBT (PBS con Tween 20 al 0,05 %) y se incubó durante 30 minutos con conjugado de anticuerpo anti-M13 y peroxidasa de rábano picante diluido 5000 veces hasta 1 nM en PBST. Las placas se lavaron, se desarrollaron con sustrato TMB durante aproximadamente cinco minutos, se interrumpieron con H₃PO₄ 1,0 M y se leyeron espectrofotométricamente a 450 nm.

Los clones que unieron el anticuerpo anti-gD y la diana pero no las proteínas no específicas se consideraron específicos positivos. La biblioteca VH permitió el aislamiento de agentes de unión específicos tanto para EGFR-ECD-Fc como para EGFRvIII-Fc.

5 ELISA de competición de unión en solución

La afinidad de unión de los clones de unión seleccionados se determinó por ELISA de competición de unión en solución.

10 Los clones de fagémidos seleccionados en *E. coli* XL1-Blue se hicieron crecer en 20 ml de caldo 2YT suplementado con carbenicilina, canamicina y fago ayudante M13-KO7; los cultivos se hicieron crecer con agitación durante toda la noche a 30 °C. El sobrenadante de los fagos se purificó por doble precipitación en PEG al 20 %/NaCl 2,5 M, se resuspendió en PBS y se leyó espectrofotométricamente a 268 nm para la determinación de la concentración (en OD/ml).

15 Los fagos purificados se titularon en inmunoplasmas recubiertas con 1 µg/ml de hEGFR-ECD-Fc para determinar la concentración óptima para el ELISA de competición en solución

20 La dilución que dio una señal de 1 OD/ml a 450 nm se usó en el ensayo de unión en solución en el cual el fago se incubó en primer lugar con concentración en aumento de antígeno (hEGFR-ECD) durante una hora y después se transfirió a inmunoplasmas recubiertas de antígeno durante 15 minutos para capturar el fago sin unir. Se calculó la IC₅₀ como la concentración de antígeno en fase de unión en solución que inhibió que el 50 % del fago se uniera al antígeno inmovilizado. El ELISA de competición de unión en solución se realizó a temperatura ambiente. Los valores IC₅₀ para los clones seleccionados variaron de 36,2 nM a > 1000 nM.

25 Conversión de la Fase de visualización de F(ab)zip a IgG humana

Para determinar con precisión la afinidad, la especificidad y otras propiedades, los clones seleccionados se expresaron como hlgG libre.

30 Los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada se clonaron en vectores previamente diseñados para la expresión transitoria de IgG humana en células de mamíferos (Leet et al., J. Mol. Biol. 23:340:1073-1093 (2004)).

35 La región V_L del ADN del fagémido se digirió con enzimas de restricción, que escindieron el ADN aguas arriba de la región que codifica para el CDR L1 (*EcoRV*) y aguas debajo de la región que codifica para el CDR L3 (*KpnI*).

La región V_H del ADN del fagémido se digirió con enzimas de restricción, que escindieron el ADN aguas arriba de la región que codifica para el CDR HI (*Apal*) y aguas abajo de la región que codifica para el CDR H3 (*BsiwI*).

40 La IgG libre secretada se purificó con una cromatografía de afinidad de proteína A y se ensayó en ELISA de unión directa en inmunoplasmas recubiertas con hEGFR.

45 Comparación de epítomos anti-hEGFR

Se estudió la capacidad de los anticuerpos anti-EGFR aislados para competir con otro anticuerpo anti-EGFR que se sabe que se une al dominio III del EGFR para determinar los epítomos reconocidos por los anticuerpos anti-hEGFR.

50 Los ensayos se realizaron en un formato de ELISA competitivo. Para el ELISA competitivo, se inmovilizó EGFR-ECD-Fc en inmunoplasmas Maxisorp a 2 µg/ml. Se capturó una concentración fijada del anticuerpo anti-EGFR (o un control de anticuerpo inespecífico) por el EGFR-ECD-Fc recubierto y se añadieron los fagos-Fab anti-EGFR seleccionados purificados y se detectaron con un HRP conjugado con α-M13. Los anticuerpos que se bloquearon a partir de la unión en placas recubiertas de EGFR-ECD-Fc seguramente comparten epítomos que se solapan.

55 Para el ELISA competitivo de TGF-α, el EGFR-ECD-Fc se capturó primero por un anticuerpo anti-Fc humano recubierto, después se capturó una concentración fijada de TGF-α por EGFR-ECD-Fc. Se añadieron los fagos-Fab purificados y se detectaron con un HRP conjugado con α-M13.

60 Finalmente, se evaluó la unión de los clones seleccionados a las construcciones con dominios expuestos y eliminados del EGFR para confirmar el ELISA competitivo previo. El clon designado D1 compete con el anticuerpo anti-EGFR y parece unirse al EGFR en el dominio III.

Ejemplo 2

65 Caracterización de anticuerpos contra el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico humano

Inhibición de la unión al ligando

Para determinar si el anticuerpo D1 anti-EGFR seleccionado inhibe la unión de ¹²⁵I-EGF a células H1666 (ATCC CRL-5885, Manassas, Va.), la versión de las IgG purificadas de D1 se ensayó en un ensayo de unión a ligando como sigue. Se colocaron en placa células H1666 en placas de 12 pocillos. El día siguiente se retiró el medio de crecimiento y las células se pretrataron con 200 nM de anticuerpo durante 2 horas a TA. Se añadieron 20 µl/pocillo de EGF radiomarcado (usar conc. Por debajo de la Kd de la línea celular) y las células se trataron durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente. Las células se lavaron con tampón de unión y se solubilizaron, se transfirieron y las muestras se contaron usando un isoData γ-Counter. El EGF sin marcar se usó como competidor frío. Los resultados demostraron que el D1 inhibe la unión del ligando ¹²⁵I-EGF a las células H1666.

Inhibición de la fosforilación del EGFR inducida por TGF-α en células EGFR-NR6 transfectadas de forma estable

Para determinar si un anticuerpo D1 anti-EGFR bloquea selectivamente la fosforilación del EGFR inducida por TGF-α, células EGFR-NR6 transfectadas de forma estable se mantuvieron en ayuno de suero durante 2-3 horas y se pre-incubaron con diversas concentraciones de D1 durante 2 horas. Las células se estimularon con TGF-α 1 nM. Los lisados de las células enteras se sometieron a análisis por SDS-PAGE, y se sondaron inmunotransferencias con anti-fosfotirosina y anti-EGFR como control de carga. Se usó un anticuerpo anti-EGFR disponible en el mercado como control positivo. Los datos demostraron que el D1 inhibe la fosforilación del EGFR inducida por TGF-α en un ensayo basado en células.

Ejemplo 3Maduración de afinidad del D1Construcción de biblioteca

Se crearon dos bibliotecas de visualización de fagos (bibliotecas L3/H3 y L3/H1H2) usando mutagénesis dirigida a oligonucleótido como se describe (Lee et al., Blood, 108, 3103-3111, 2006). Los vectores molde de la biblioteca contenían un codón de fin (TAA) incrustado en el CDR-L3, que se reapareó durante la reacción de mutagénesis usando oligonucleótidos degenerados que se alineaban sobre las secuencias que codifican el CDR-L3 (todas las bibliotecas), el CDR-H3 (biblioteca L3/H3), el CDR-H2 y el CDR H1 (biblioteca L3/H1H2). Las reacciones de mutagénesis de la biblioteca se realizaron de acuerdo con el método de Kunkel et al (Methods Enzymol. 1987;154:367-82). Los oligonucleótidos se combinaron en diferentes relaciones para afinar y ajustar la diversidad para reflejar la frecuencia de aminoácidos en el repertorio natural en las posiciones seleccionadas. Los productos de mutagénesis se agruparon en una reacción por biblioteca y se electroporaron en células de *E. coli* SS320 y se hicieron crecer suplementadas con fago ayudante KO7 como se describe (Lee et al., 2004, arriba).

Clasificación y exploración de la biblioteca

Para la selección de mejora de afinidad, las bibliotecas de fagos se sometieron a clasificación en placa contra hEGFR-EGD-Fc en la primera ronda, seguido de tres rondas de clasificación en solución.

Se realizaron tres rondas de clasificación en solución con rigor de selección en aumento. Las inmunoplasmas se recubrieron con 5 µg/ml de Neutravidina durante toda la noche a 4 °C y se bloquearon con Superblock (Pierce) y PBST. Se pre-incubaron 3-5 OD-ml de fago propagado con 100 nM de EGFR-ECD biotinilado en Superblock, después se diluyó 10x y se añadió a inmunoplasmas bloqueadas durante 5-10 minutos. Las placas se lavaron 8 veces, el fago se eluyó y se propagó para la siguiente ronda de clasificación en solución, disminuyendo la entrada de fago (0,5 OD/ml) y la concentración de EGFR-ECD biotinilado hasta 1 nM.

ELISA de exploración de afinidad de alto rendimiento (Competición de punto único)

Se cogieron clones aleatorios de la última ronda de clasificación en solución para la exploración y se ensayaron usando un ELISA de competición de punto único de fagos en el que se compara la unión a la diana de los sobrenadantes de fagos pre-incubados (o no) con hEGFR-ECD-

Los clones de fagémidos en *E. coli* XL1-Blue se hicieron crecer en 150 µl de caldo 2YT suplementado con carbenicilina y fago ayudante M13-KO7; los cultivos se hicieron crecer con agitación durante toda la noche a 37 °C en un formato de 96 pocillos. Los sobrenadantes del cultivo que contenían fagos se diluyeron cinco veces en PBST (PBS con Tween 20 al 0,05 % y BSA al 0,5 % (p/v)) con o sin EGFR-EC 5 nM. La reducción de OD (%) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Reducción de OD}_{450\text{nm}} (\%) = (\text{OD}_{450\text{nm}} \text{ de los pocillos con competidor}) / (\text{OD}_{450\text{nm}} \text{ de los pocillos sin competidor}) * 100$$

Los clones con una reducción de OD mayor del 25 % se seleccionaron para el ELISA de competición de unión en solución.

ELISA de competición de unión en solución

La afinidad de unión de los clones de unión seleccionados por ELISA de punto único se determinó por ELISA de competición de unión en solución como se describe anteriormente.

Los IC50 de los fagos de un clon seleccionado de maduración de afinidad patente del clon D1 (D1.5) se determinó como se describe anteriormente. La IC50 para D1.5 fue 0,39 nM. D1.5 se reformateó en mlgG2A para una caracterización adicional, usando el mismo sitio de restricción descrito anteriormente y vectores diseñados para la expresión transitoria de IgG murina en células de mamíferos.

Ejemplo 4Caracterización de anticuerpos mejorados anti-EGFR como mlgG libreMedición BIAcore

Se usaron ensayos de resonancia de plasmón en superficie en un BIAcore™-2000 para determinar la afinidad de una mlgG2A anti-EGFR. Se usaron mlgG D1.5 inmovilizadas en chips de C5M a ~ 150 unidades de respuesta (RU) en los ensayos BIAcore. Se inyectaron concentraciones en aumento desde 12,5 nM hasta 200 nM de EGFR-ECD a 30 µl/min a 25 °C. Las respuestas de unión se corrigieron sustrayendo las RU de una celda de flujo en blanco. Para los análisis cinéticos, se usó un modelo de Languir 1:1 de ajuste simultáneo de $K_{\text{encendido}}$ y K_{apagado} . La KD determinada por este método para D 1.5 fue 1,2 nM.

Mapeado de epítomos

Se evaluó la unión de clones seleccionados a las construcciones con dominios expuestos y eliminados del EGFR para confirmar la unión al epítopo heredada de clones parentales. D1.5, el clon de afinidad mejorada seleccionado de la clasificación D1, se une al EGFR en el dominio III.

Inhibición de la fosforilación del EGFR inducida por TGF- α en células EGFR-NR6

Se ensayó D1.5 para determinar si inhibía la fosforilación del EGFR inducida por TGF- α con mayor potencia en comparación con el clon parental. Los anticuerpos se ensayaron en células EGFR-NR6 y el ensayo se realizó como se describe anteriormente en el Ejemplo 2. Se usó un anticuerpo anti-EGFR disponible en el mercado como un control positivo.

Los resultados demostraron que D1.5 mostró una mayor inhibición de la fosforilación del EGFR inducida por ligando en comparación con el clon parental D1.

Inhibición de la proliferación celular en células H1666

Se realizó un ensayo para determinar si D1.5 inhibe la proliferación celular de una línea celular de cáncer, H1666, que expresa EGFR, HER2 y HER3 en niveles moderados. Las células H1666 (ATCC CRL-5885, Manassas, Va.) se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5000 células. El día siguiente las células se trataron simultáneamente con diversas concentraciones de anticuerpo (hasta 50 µg/ml) en medio que contiene suero al 1 %. Después de tres días se añadió Azul Alamar y se detectó la fluorescencia usando un fluorómetro. Los resultados se expresaron en RFU.

Los resultados demostraron que D1.5 demostró una inhibición del crecimiento celular mejor que D1.

Estudio de xenoinjerto A431

Se usó un modelo de xenoinjerto A431 para validar la eficiencia *in vivo* de anticuerpos anti-EGFR de afinidad madurada de D1.5. Las células A431 se amplifican por EGFR y responden muy bien a los agentes anti-EGFR. El estudio se llevó a cabo en ratones nu/nu y se usó como referencia un anticuerpo anti-EGFR disponible en el mercado.

En una primera etapa, se evaluó la reactividad cruzada de D1.5 con EGFR murino en un ELISA competitivo. Las inmunoplasmas se recubrieron con hEGFR-ECD-Fc. Se incubaron diluciones seriadas de mEGFR-ECD-Fc con una concentración fija de D1.5. Los resultados mostraron que D1.5 reaccionó de forma cruzada con EGFR murino. Para evaluar la dosificación necesaria para el estudio de eficiencia *in vivo*, se inyectó D1.5 en primer lugar a una dosis única (50 mg/kg) y se midieron las concentraciones de IgG en suero por ELISA. D1.5 se retiró más rápidamente y se vieron concentraciones en disminución después de siete días tras la inyección. El estudio de eficiencia (modelo de xenoinjerto A431) reveló que D1.5 inhibió el crecimiento tumoral completamente. D1.5 era tan eficaz como el anticuerpo anti-EGFR a 50 mg/kg. Su potencia reducida en el grupo de dosis menor (25 mg/kg) se debió al rápido aclarado del anticuerpo (Figura 1).

Ejemplo 5Diseño de la biblioteca de cadena ligera y exploración para anticuerpos biespecíficos5 Diseño y construcción de las bibliotecas

Las bibliotecas basadas en un molde de D1.5 se diseñaron para diversificar la composición de aminoácidos y la longitud del CDR de la cadena ligera del anticuerpo. Se adaptó un subconjunto de las posiciones aleatorizadas para representar los aminoácidos que son parte del repertorio natural en estos sitios, mientras que los sitios que quedan se aleatorizaron para incluir los 20 aminoácidos de origen natural. Además, las posiciones aleatorizadas en el CDR L3 se adaptaron y se sesgaron hacia la secuencia nativa del molde porque este CDR se considera importante para la construcción de D1.5. Para el CDR L1, cada longitud era una mezcla de tres oligonucleótidos que contienen codones para las posiciones 28-33. Para L1 más largos, se insertó NNK entre la posición 30 y 31.

Posiciones	28	29	30	31	32	33
CDR-L1	G ₇₀ A ₇₀ C ₇₀	RTT	NNK	NNK	TAC	STA
	G ₇₀ A ₇₀ C ₇₀	RTT	NNK	NNK	DGG	STA
	G ₇₀ A ₇₀ C ₇₀	RTT	NNK	NNK	NMT	STA

15

Para el CDR L2, se mezclaron cuatro oligonucleótidos 1:1:2:10.

	50	51	52	53
CDR-L2	NKK	GST	TCC	NNK
	TGG	GST	TCC	NNK
	KGG	GST	TCC	TMT
	NKK	GST	TCC	TMT

20

N=A/C/G/T, D=A/G/T, V=A/C/G, B=C/G/T, H=A/C/T, K=G/T, M=A/C, R=A/G, S=G/C, W=A/T, Y=C/T.

*G₇₀A₇₀C₇₀ permite el 70 % del nucleótido diseñado y un 10 % de cada uno de los otros tres codifican aproximadamente el 50 % Glu y el 50 % de los otros aminoácidos. Véase la Patente de EE.UU. con N.º de Publicación 20080069820 y Bostrom, J. et al., Science 323:1610-1614(2009).

25 La diversidad para el CDR L3 deriva de la mezcla de los siguientes oligonucleótidos. Oligonucleótidos D1.5 CDR_L3

F693 ACTTATTAC TGT CAG CAA 878 NNK 776 RST CCT TAC ACG TTC GGA (SEQ ID: 70)

F694 ACTTATTAC TGT CAG CAA 878 TAC 776 RST CCT TAC ACG TTC GGA (SEQ ID: 71)

F695 ACTTATTAC TGT CAG CAA DGG NNK 776 577 CCT TAC ACG TTC GGA (SEQ ID: 72)

F696 ACTTATTAC TGT CAG CAA KMT NNK 776 577 CCT TAC ACG TTC GAGA (SEQ ID: 73)

30 **F697** ACTTATTAC TGT CAG CAA 878 NNK 776 NNK CCT TAC ACG TTC GGA (SEQ ID: 74)

F698 ACTTATTAC TGT CAG CAA DGG NNK NNK RST CCT TAC ACG TTC GGA (SEQ ID: 75)

F699 ACTTATTAC TGT CAG CAA KMT NNK NNK RST CCT TAC ACG TTC GGA (SEQ ID: 76)

5=70 % A, 6=70 % G, 7=70 % C, 8=70 % T (10 % para el resto de los tres nucleótidos)

35 En todas las bibliotecas la cadena pesada se mantuvo constante con la secuencia clon parental. Todos los moldes de la biblioteca contenían un codón de fin incrustado en el CDR L1 que prevenía la presencia del molde de la cadena ligera entre los miembros de la biblioteca de anticuerpos de visualización de fagos.

40 Las bibliotecas se construyeron por el método de mutagénesis (mutagénesis de Kunkel) usando el molde de ADN de cadena sencilla que contiene el codón de fin para alinear con los conjuntos de oligonucleótidos para los tres CDR L1, L2 y L3 simultáneamente. El ADN de mutagénesis de la biblioteca se transformó en la cepa celular bacteriana SS320 por electroporación y se hizo crecer con el fago ayudante KO7. Se evaluaron las colonias únicas de las bibliotecas construidas para los niveles de visualización mediante la detección de la Etiqueta gD en el C-terminal de la cadena ligera y para la retención de la unión por el antígeno primario (EGFR) en un formato ELISA de punto único. Una media del 35 % de las colonias únicas evaluadas de las bibliotecas de D1.5 muestran un alto nivel de visualización y retenían la propiedad de unión al EGFR.

45

Clasificación de bibliotecas y exploración para el aislamiento de clones específicos duales

50 Las bibliotecas se sometieron a una ronda inicial de selección de unión con un anticuerpo anti-gD como la diana de captura para eliminar clones en los que el gen Fab se había eliminado o no se expresaba, y de selección de unión con el hEGFR-ECD-Fc, seguido de 4 rondas de selección de antígenos en placa (HER2-ECD, HER2-ECD-Fc, HER2-I-III-Fc, HER3-ECD-Fc, HER4-ECD-Fc (en cada caso el Fc en las construcciones de fusión es el fragmento de unión al complemento de hIgG1)). De forma alternativa, se sometieron directamente a la selección de unión a diana sin pre-selección con anti-gD y hEGFR-ECD-Fc.

55

Cada ronda de selección en placa se realizó como se ha descrito previamente en el Ejemplo 3. Los clones aleatorios de la ronda 3 y 4 se seleccionaron para exploración y se ensayaron usando ELISA de fagos en el cual la unión a la diana y a anti-gD se comparó con la unión a una proteína no relevante (BSA) para comprobar la unión no específica. Los clones que unieron el anticuerpo anti-gD y la diana pero no los controles de proteínas no diana (tales como albúmina de suero bovino, otras IgG) se consideraron específicos positivos.

Las regiones de dominios de cadena ligera de los clones positivos se amplificaron por PCR y se secuenciaron. El análisis de la secuencia de ADN de los agentes de unión específicos positivos revelaron 1 único agente de unión tanto para el EGFR como para el HER2 (D1.5-201 (SEQ ID NO: 36)), 7 agentes de unión únicos tanto para el EGFR como para el HER3 (D1.5-100 (SEQ ID NO: 40), D1.5-103 (SEQ ID NO: 41), D1.5-113 (SEQ ID NO: 42), D1.5-115 (SEQ ID NO: 43), D1.5-116 (SEQ ID NO: 44), D1.5-121 (SEQ ID NO: 45), D1.5-122 (SEQ ID NO: 46)), 1 único agente de unión tanto para el EGFR como para el HER4 (D1.5-400, (SEQ ID NO: 39)).

Ocho de los nueve clones biespecíficos retenían la prolina en la posición 93 en la HVR L3. Ya que la adopción de prolina en esta posición (con tirosina en la posición 96) aumentaba drásticamente la afinidad del D1.5 por el EGFR en comparación con su clon parental D1, parece que contribuye a la retención de la unión al EGFR.

Evaluación de la especificidad de los clones fagos biespecíficos hEGFR/HER2, hEGFR/HER3, hEGFR/HER4

Para determinar si los nueve clones con actividades duales eran específicos a sus dianas cognadas, se evaluó su unión a un panel de antígenos en un ELISA directo en placa.

Se recubrieron 2 µg/ml de varias proteínas en inmunoplasmas durante toda la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con BSA en PBST al 1 % y se aplicó a la placa durante 30 minutos una dilución de sobrenadante de fago-Fab crecido como se describe en el Ejemplo 1.

Las placas se lavaron y se grabaron las señales de unión y se analizaron como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados muestran que todos los clones con especificidades duales eran específicos a su diana cognada. Los clones D1.5-4 y el clon parental D1.5 se usaron como control (Figura 2).

Ejemplo 6

Caracterización de anticuerpos con especificidad dual como mIgG libre

Todos los clones con especificidad dual se reformatearon en mIgG2A para una caracterización adicional, usando el mismo sitio de restricción descrito anteriormente y los vectores previamente diseñados para la expresión transitoria de IgG murina en células de mamíferos.

Inhibición de la fosforilación del EGFR inducida por TGF-α en células EGFR-NR6

Para determinar si los siete anticuerpos seleccionados con especificidad dual bloqueaban la fosforilación del EGFR inducida por TGF-α, se trataron células EGFR-NR6 transfectadas de forma estable como se describe en el Ejemplo 2. Los datos en la Figura 3 demostraron que los anticuerpos EGFR/HER3 y EGFR/HER2 inhibieron la fosforilación del EGFR inducida por TGF-α a concentración alta. Se usó un anticuerpo anti-EGFR disponible en el mercado como un control positivo.

Una respuesta a dosis en los clones D1.5-100 y D1.5-103 mostró que el clon D1.5-100 perdió su alta potencia del clon parental (D1.5) para inhibir la fosforilación del EGFR. D1.5-103, sin embargo, tenía una potencia similar a D1.5 en este ensayo.

Inhibición de la unión de herregulina a HER3 por anticuerpos anti-EGFR/HER3

Para determinar si los anticuerpos anti-EGFR/HER3 seleccionados podían inhibir la unión de herregulina a la proteína HER3-ECD-Fc, se ensayaron IgG purificadas en un ensayo de unión a ligando radiomarcado.

Los ensayos de unión se realizaron en pocillos de tiras separables Nunc. Las placas se recubrieron a 4 °C durante toda la noche con 100 µl de cabra 5 mg/ml anti-Ab humano en tampón carbonato 50 mM (pH 9,6). Las placas se aclararon dos veces con tampón de lavado (PBS/Tween20 al 0,005 %) y se bloquearon con 100 µl de BSA al 1 % en PBS durante 30 min. El tampón se retiró y cada pocillo se incubó con 200 ng de HER3-ECD-Fc en BSA/PBS durante 1,5 h. Las placas se enjuagaron tres veces con tampón de lavado y se pre-unieron anticuerpos en BSA al 1 %/PBS al HER3-IgG a 4 °C durante toda la noche. Se añadió ¹²⁵I-HGR y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se enjuagaron tres veces y los pocillos individuales se contaron usando un isoData γ-Counter Serie 100 (Figura 4). Los resultados demuestran que los siete anticuerpos con especificidad dual para el EGFR y el HER3 pueden inhibir la unión de la herregulina al HER3-ECD-Fc.

Inhibición de la unión de herregulina a HER4 por anticuerpos anti-EGFR/HER4

Para determinar si el anticuerpo D1.5-400 anti-EGFR/HER4 seleccionado podía inhibir la unión de herregulina a HER4-ECD-Fc se realizó un ensayo de unión a ligando como se describe anteriormente. Se usaron 25 ng de HER4-ECD-Fc en lugar de HER3-ECD-Fc. Los resultados demuestran que D1.5-400 inhibió la unión de la herregulina al HER4.

Inhibición de la fosforilación de HER2/HER3 inducida por herregulina en células MCF7.

Para determinar si los siete anticuerpos seleccionados con especificidad dual por el EGFR y el HER3 podían inhibir la fosforilación de HER2/HER3 inducida por herregulina en las células MCF7, se ensayaron en un ensayo de fosforilación de receptor: las células MCF-7 (ATCC HTB 22, Manassas, Va.) se colocaron en placa en placas de 12 pocillos. Después de estar en ayunas de suero, las células se incubaron con los anticuerpos indicados (75 µg/ml o 150 µg/ml) durante 2 horas. Las células se estimularon con HRG 0,5 nM durante 8 minutos y los lisados celulares totales se corrieron en SDS-PAGE y se sondaron transferencias Western con anti-fosfo-HER3, anti-pTyr o anti-tubulina como control de carga. (Figura 5). Los resultados demuestran que todos los anticuerpos anti-EGFR/HER3 inhibían la fosforilación de HER2/HER3 inducida por herregulina en altas concentraciones. Se usó pertuzumab (Pmab) como un control positivo.

Inhibición de la proliferación celular de MDA-175

Para determinar el potencial inhibidor del crecimiento de anticuerpos anti-EGFR/HER3 en un crecimiento celular dirigido por HRG, se pusieron en placa células MDA-175 (ATCC HTB 25, Manassas, Va.) (20000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos. El día siguiente las células se trataron simultáneamente con diversas concentraciones de anticuerpo (hasta 50 µg/ml) en medio que contiene suero al 1 %. Después de 4 días o bien 5 días, se añadió Azul Alamar y se detectó la fluorescencia usando un fluorómetro. Los resultados se expresaron en RFU. Se eligieron células MDA-175 ya que su crecimiento es el resultado de una estimulación autocrina por HRG. El anticuerpo D1.5-100 anti-EGFR/HER3 y el clon D1.5-122 mostraron inhibición del crecimiento celular en MDA-175. Se usó pertuzumab (Pmab) como un control positivo. (Figura 6).

Ejemplo 7Estudio de mapeo por mutagénesis de D1.5-100 y D1.5-103, anticuerpos biespecíficos anti-hEGFR/HER3

Se realizó un análisis de exploración de "shotgun" homólogo y de alanina usando bibliotecas de visualización de fagos (Vajdos et al., J. Biol. Biol. 320:415-28 (2002)) para investigar la interacción entre cada anticuerpo con sus dos antígenos, EGFR y HER3.

Las selecciones de unión en los antígenos (hEGFR y HER3) para aislar los clones funcionales, seguido de la secuenciación del ADN permitió los cálculos de las relaciones tipo silvestre/mutante en cada posición variada. Estas relaciones se usaron después para determinar la contribución de cada cadena lateral escaneada a la unión al EGFR y al HER3.

Los resultados permitieron mapear el parátipo funcional para la unión del EGFR y el HER3.

Diseño de bibliotecas "shotgun" Do-700 y D1.5-103

Los restos expuestos al disolvente en los CDR se escanearon usando bibliotecas de visualización de fagos en las cuales los restos del tipo silvestre se dejaron variar como alanina o bien tipo silvestre (barrido de alanina) o como un resto homólogo o tipo silvestre (barrido homólogo). La naturaleza del código genético requería alguna otra sustitución a incluirse en la biblioteca además de los restos Wt/Alanina o Wt/Homólogo. Se construyeron bibliotecas separadas de barrido de alanina y homólogo de cadena pesada y de cadena ligera. La degeneración varió de $1,3 \times 10^5$ a $7,5 \times 10^7$.

Bibliotecas de barrido de constricción o "shotgun"

Las bibliotecas se construyeron como se ha descrito previamente salvo porque se expresó un único Fab en la superficie del bacteriófago fusionado al dominio C-terminal del gen-3 M13 de la proteína de superficie menor, después de la retirada de la cremallera de leucina del plásmido original por mutagénesis kunkel (Oligo F220: TCT TGT GAC AAA ACT CAC AGT GGC GGT GGC TCT GGT). (SEQ ID NO: 77)

La biblioteca de barrido de alanina y de homólogo de cadena ligera tenía codones de fin en HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 y las bibliotecas de barrido de alanina y de homólogo de cadena pesada contenían codones de fin en cada HVR de cadena pesada. Las bibliotecas se construyeron por los métodos previamente descritos (Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338:299-310 (2004)) usando mutagénesis de Kunkel (Kunkel et al., 1987, arriba) en los moldes de fin respectivos. Las bibliotecas de barrido de alanina son bibliotecas de visualización de fagos que permiten que las cadenas

laterales seleccionadas varíen como tipo silvestre o alanina. Barrido de homólogo significa que las bibliotecas de visualización de fagos permiten que las cadenas laterales seleccionadas varíen como tipo silvestre o aminoácidos similares.

5 Selección de biblioteca

Se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp NUNC de 96 pocillos con 5 µg de diana de captura (EGFR-ECD-Fc, HER3-ECD-Fc o Proteína L) y se bloquearon con BSA al 1 % (p/v) en PBS. Los fagos de las bibliotecas anteriormente descritas se propagaron con fago ayudante KO7 (NEB) como se describe (Lee et al., 2004, arriba). Las soluciones de fagos de la biblioteca se añadieron a las placas recubiertas a una concentración de 10¹³ partículas de fago/ml y se incubaron durante 1-2 h a TA. Las placas se lavaron 8 veces con PBST y se siguió de elución de los fagos unidos con HCl 0,1 M durante 30 min. El enriquecimiento después de cada ronda de selección se determinó como se ha descrito previamente. Después de 2 rondas de selección de diana, se seleccionó un número de clones al azar de cada biblioteca para la secuenciación como se ha descrito (Sidhu et al., 2004, arriba).

Las secuencias de ADN de los clones que se unen se usaron para determinar las relaciones tipo silvestre/mutación en cada posición variada. Las relaciones se usaron para evaluar la contribución de la unión al antígeno de cada cadena lateral seleccionada. Dividir la relación wt/mut a partir de la selección de antígenos por la relación wt/mut a partir de la selección de visualización proporciona el estimado cuantitativo del efecto de cada mutación en la afinidad de unión a antígeno (relación de función $F_{wt/mut}$). Si la relación es mayor de 1, la mutación es deletérea. Si la relación es menor de 1, la mutación es beneficiosa. Se secuenciaron 2500 clones.

Basándose en los resultados de barrido de alanina y de homólogo, los puntos calientes del anticuerpo D1.5-100 para la unión del EGFR y el HER3 se mapearon en la estructura del anticuerpo conocido 4D5-Fv anti-HER2. Como se muestra en la Figura 7 el mapeado sugiere que para la unión del EGFR, domina la cadena pesada, y las cadenas pesada y ligera funcionan juntas para la unión del HER3. Los restos ácidos (E, D) juegan un papel importante uniendo tanto EGFR como HER3, y especialmente HER3.

30 Maduración de afinidad

La figura 8 ilustra la maduración de afinidad de D1.5-100, usando las bibliotecas de "shotgun" descritas anteriormente. En esta estrategia de maduración de afinidad, se clasificó la biblioteca de homólogos de cadena pesada de D1.5-100 como se ha descrito previamente. Después de dos rondas de clasificación en placa se realizó en placas recubiertas con HER3-ECD-Fc, y las tres rondas de dianas alternativas en solución se clasificaron en rigurosidad en aumento (EGFR-ECD y HER3-ECD-Fc). Los clones únicos se cogieron y se evaluaron en un ELISA de punto único para aislar clones que retuvieran la actividad de unión dual. Entre los clones evaluados, 79 de 9 mostraron unión por ambos EGFR/HER3, mientras que 11 perdieron la unión al EGFR y mostraron unión específica por el HER3.

40 Aislamiento de clones por competición de punto único

Las colonias únicas de la última ronda de clasificación se recogieron y los fagos se hicieron crecer como se describe en el Ejemplo 1. Se recubrieron 384 pocillos con EGFR-ECD-Fc a 1 µl/ml. Para cada colonia crecida, se incubaron 25 µl de sobrenadante de fago o de tampón ELISA con 25 µl de EGFR-ECD (50 nM) y HER3-ECD-Fc (10 nM). Se añadieron 4 µl de incubación a la placa recubierta con EGFR-ECD-Fc y la placa se lavó ocho veces. Se añadieron 60 µl de conjugados de anticuerpo anti-M13-HRP 1/5000, la placa se lavó ocho veces y se desarrolló con TMB + H₃PO₄.

Se seleccionaron ocho clones únicos que mostraron mayor inhibición que D1.5-100 por el EGFR y el HER3, usando el siguiente protocolo de competición de punto único:

1. Se recogieron colonias únicas de la última ronda de clasificación y se hicieron crecer los fagos como se ha descrito previamente;
2. se recubrió una placa de 384 pocillos con EGFR-ECD-Fc a 1 µg/ml;
3. Para cada colonia crecida, se incubaron 25 µl de sobrenadante de fagos o de tampón ELISA con 25 µl de EGFR-ECD (50 nM) y HER3-ECD-Fc (10 nM);
4. Se añadieron 4 µl de incubación a la placa recubierta de EGFR-ECD-Fc;
5. La placa se lavó 8 veces;
6. Se añadieron 60 µl de conjugados de anticuerpo anti-M13-HRP 1/5000;
7. La placa se lavó ocho veces
8. La placa se desarrolló con TMB + H₃PO₄.

Se seleccionaron 8 clones únicos que mostraron mejor inhibición que D1.5-100 tanto para EGFR como para HER3 (DL6, SEQ ID NO: 63; DL7, SEQ ID NO: 64; DL8, SEQ ID NO: 65; DL9, SEQ ID NO: 66; DL10, SEQ ID NO: 67; DL11, SEQ ID NO: 28; DL12, SEQ ID NO: 68; DL13, SEQ ID NO: 69). Para los anticuerpos anti-HER3, se seleccionaron 7 clones únicos que mostraron mejor inhibición que D1.5-100 para HER3.

Caracterización de anticuerpos biespecíficos y anti-HER3 de afinidad madurada

La especificidad de la unión de los anticuerpos biespecíficos seleccionados de afinidad madurada se evaluó por unión directa a un panel de diversas proteínas como se ha descrito en el Ejemplo 5. Como se muestra en la Figura 9, los anticuerpos seleccionados mostraron especificidad de unión tanto para EGFR como para HER3.

Los valores IC50 se calcularon para dos anticuerpos biespecíficos seleccionados (DL7 y DL11) como se describe en el Ejemplo 1 y se compararon con el clon parental D1.5-100. Ambos anticuerpos biespecíficos seleccionados mostraron una afinidad similar por el HER3-ECD-Fc y una afinidad aumentada por el EGFR. DL1.5-100 tenía un IC50 de 44 nM para EGFR-ECD, 0,1 nM para HER3-Fc; DL7 tenía un IC50 de 6,1 nM para EGFR-ECD, 0,25 nM para HER3-Fc; DL11 tenía un IC50 de 5,7 nM para EGFR-ECD, 0,43 nM para HER3-Fc.

La especificidad de la unión de los anticuerpos anti-HER3 se evaluó por unión directa a un panel de diversas proteínas como se ha descrito previamente. Los anticuerpos seleccionados (DL3.5, DL3.6, DL3.7) mostraron una especificidad de unión solamente para HER3.

Los valores IC50 de fagos se calcularon para los anticuerpos seleccionados como se describe anteriormente y se compararon con el clon parental D1.5-100. Todos los anticuerpos (DL3.1-3.7) mostraron afinidad aumentada por HER3-ECD-Fc con IC50 entre 1 y 3,8 nM. El DL 1.5-100 tuvo un IC50 de 4,6 nM.

La unión de los anticuerpos biespecíficos seleccionados y los anticuerpos anti-HER3 se comparó con la unión de la proteína del dominio III de HER3 (etiqueta His N-terminal) usando el ELISA de competición descrito anteriormente. EGFR/HER3 y los anticuerpos anti-HER3 mono-específicos tenían afinidades similares por HER3-ECD-Fc y las construcciones del dominio III de HER3 (IC50 del fago).

Los anticuerpos biespecíficos de afinidad madurada seleccionados y los anticuerpos anti-HER3 se reformatearon en mIgG2A y se validaron en un ELISA de competición, como se describe anteriormente. Los anticuerpos biespecíficos mIgG2A mostraron afinidad aumentada tanto por EGFR-ECD como por el dominio III del HER3 en comparación con el clon parental D1.5-100.

Usando BIAcore 300 para el análisis cinético de anticuerpos DL7 y DL11 de afinidad madurada EGFR/HER3, y anticuerpos específicos anti-HER3 DL3.6 y DL3.7, mIgG2A purificada de cada anticuerpo (DL7.1.5-100, DL7, DL11, DL3.6, DL3.7) se acopló en un chip CM, y se hicieron fluir varias diluciones de antígeno (EGFR-ECD, dominio III de HER3, HER3-ECD) sobre el chip recubierto en las condiciones descritas en el Ejemplo 4. El chip CM5 se regeneró entre cada inyección de antígeno. Finalmente, se determinó la KD usando un análisis de unión 1:1 con transferencia de masas. Los anticuerpos DL7 y DL11 de afinidad madurada al EGFR/HER3 tenían KD (M) mejoradas para ambas dianas.

Para evaluar la función inhibidora de los anticuerpos de afinidad madurada DL7, DL11 y el anticuerpo parental D1.5 en el EGFR, se pretrataron células EGFR-NR6 que solamente expresan el EGFR con diversas cantidades de anticuerpos (hasta 20 µg/ml) durante una hora y, posteriormente, se indujo la fosforilación del EGFR por el TGF-α (5 nM). La inhibición de la fosforilación del receptor por los anticuerpos se detectó usando un anticuerpo anti-Fosfotirosina. También se vieron las inhibiciones de MAPK de forma dependiente de la dosis. El anticuerpo DL11 era más potente que el DL7 inhibiendo la fosforilación del EGFR y del ERK1/2 (Figura 10A).

Se comparó la función inhibidora de DL7, DL11 y el anticuerpo DL3.6 anti-HER3 mono-específico en la transactivación de HER3. (Figura 10B). Las células MCF-7 que expresan HER2, HER3 y EGFR se pretrataron con las cantidades indicadas de anticuerpo (hasta 50 µg/ml) durante una hora, y la activación del HER3 y la transfosforilación del HER3 se indujo por HRG. La inhibición de la fosforilación de HER3 se detectó usando un anticuerpo anti-fosfoHER3. La inhibición de las moléculas de señalización aguas abajo, ERK1/2 así como Akt, se vio de forma dependiente de dosis. De nuevo DL11 era más potente que DL7.

Se comparó la función inhibidora del crecimiento de DL 11 con aquella de un anticuerpo anti-EGFR disponible en el mercado, pertuzumab, y un anticuerpo anti-HER3, o a aquella de DL3.6, D1.5 o la combinación de D1.5 más DL3.6, se estimuló el crecimiento de células H1666 (ATCC CRL-5885, Manassas, Va.) (una línea celular de NSCLC que expresa HER2, HER3, EGFR y ligandos de EGFR) (6000 células/pocillo) con HRG (3 nM). Los anticuerpos se evaluaron de forma dependiente de dosis y las características inhibidoras del crecimiento se compararon con todos los otros anticuerpos mono-específicos. Como se muestra en la Figura 11A, DL11 inhibió el crecimiento celular en un grado mayor que los anticuerpos mono-específicos o las combinaciones de los mismos.

Se obtuvieron resultados similares cuando el ensayo se repitió usando células H1666 con crecimiento estimulado por HRG (3 nM) + TGFα (6 nM). (Figura 11B).

La función inhibidora del crecimiento de DL11 se comparó con pertuzumab, un anticuerpo anti-EGFR, y un anticuerpo anti-HER3, o DL3.6, D1.5 o la combinación de D1.5 más DL3.6 en células HCA-7. HCA7 es una línea celular colorrectal que expresa HER2, HER3 y EGFR. El crecimiento celular se estimuló con HRG (3 nM) en

presencia de suero al 1 %. Los anticuerpos se evaluaron de forma dependiente de dosis y se detectó la viabilidad celular después de 3 días, usando el reactivo Azul Alamar. Como se muestra en la figura 12A, DL11 mostró características inhibitorias del crecimiento superiores comparadas con los otros tratamientos.

5 La inhibición del crecimiento celular de HCA-7 se investigó como se describió en conexión con la figura 12A, salvo que el crecimiento se estimuló con HRG (3 nM) más TGF α (5 nM). Como se muestra en la Figura 12B, DL11 mostró características inhibitorias del crecimiento superiores comparadas con los otros tratamientos.

10 Se investigó la inhibición del crecimiento de Calu-3 por DL11 en comparación con un anticuerpo anti-EGFR, pertuzumab y un anticuerpo anti-HER3. La línea celular de NSCLC Calu-3 (ATCC HTB-55, Manassas, Va.) sobreexpresa HER2 y tiene niveles normales de HER3 y EGFR. El crecimiento celular se estimuló con HRG (3 nM) en presencia de suero al 1 %. y los anticuerpos se evaluaron de forma dependiente de dosis. Como se muestra en la Figura 13, DLL mostró actividad superior en comparación con los anticuerpos mono-específicos.

15 Ejemplo 8

Estudio de mapeo por mutagénesis de D1.5-201 y D1.5-201-2, anticuerpos biespecíficos anti-hEGFR/HER2

20 Para la maduración de afinidad de D1.5-201, se diseñó una biblioteca de cadena ligera suave/homólogo con aminoácidos seleccionados. Algunos restos suaves se aleatorizaron en suave, donde la frecuencia del resto de tipo silvestre era el 50 %. Algunos restos se aleatorizaron usando codones que codifican para el resto de tipo silvestre o el resto homólogo. Algunas aleatorizaciones homólogas permiten 1 o 2 restos extra entre el tipo silvestre y el homólogo. Finalmente, algunos restos no se cambiaron.

25 La Figura 14 ilustra otra estrategia de clasificación para la maduración de afinidad de D1.5-201. En esta estrategia, se clasificó una biblioteca de cadena ligera suave/homólogo como se ha descrito previamente. Después de tres rondas de alternar en placa/en solución, se realizó la clasificación en HER2/ECD con rigurosidad en aumento, se cogieron clones únicos y se evaluaron en un ELISA de punto único para aislar clones que retenían actividad de unión dual para el EGFR y el HER2. Entre los clones evaluados, 77/192 mostraron unión tanto para el EGFR y el HER2.

30 Se determinaron las secuencias de la región variable de cadena ligera para los anticuerpos biespecíficos EGFR/HER2 de afinidad madurada (D1.5-201 (SEQ ID NO: 36, D1.5-201-2 (SEQ ID NO: 37, D1.5-201-3 (SEQ ID NO: 38)). Se calcularon las IC50 de los fagos para dos anticuerpos seleccionados biespecíficos de afinidad madurada (D1.5-201-2, D1.5-201-3) como se ha descrito previamente y se compararon con el clon parental D1.5-201. Ambos anticuerpos biespecíficos de afinidad madurada mostraron afinidad aumentada por HER2-ECD y EGFR-ECD.

40 Ejemplo 9

Maduración de la afinidad de DL11

45 Se maduró la afinidad de DL11 adicionalmente como se describe anteriormente dando como resultado dos anticuerpos biespecíficos adicionales con especificidad para el EGFR y el HER3 (DL11b y DL11f) y dos anticuerpos específicos para HER3 (DL73-11fb y DL73-11f). La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y de la cadena ligera de DL11b se muestran en SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y de la cadena ligera de DL11f se muestran en SEQ ID NO: 14 y 13, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y de la cadena ligera de DL73-11b se muestran en SEQ ID NO: 19 y 13, respectivamente y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y de la cadena ligera de DL3-11f se muestran en SEQ ID NO: 20 y 13, respectivamente.

Ensayo de afinidad Biacore

55 Se determinaron las afinidades de unión de DL11b y DL11f por sus dianas EGFR y HER3 en el siguiente ensayo de Biacore. Tanto DL11b como DL11f mostraron afinidad mejorada por sus dianas en comparación con DL11.

60 Las mediciones se realizaron usando resonancia de plasmón de superficie en un instrumento BIAcore™ 2000 (GE Healthcare, BIAcore Life Sciences, Piscataway, NJ). Se clonaron ADNc que codifican los dominios extracelulares (ECD) del EGFR humano (aminoácidos 1-637) y del HER3 humano (aminoácidos 1-640) se clonaron en un vector de expresión de mamíferos que contiene secuencias que codifican la región Fc de la IgG1 humana para generar proteínas de fusión Fc humanas. Se produjeron EGFR-IgG1 (2,65 mg/ml), HER3-IgG humana (3,35 mg/ml) recombinantes transfectando transitoriamente células de ovario de hámster chino y se purificaron a través de cromatografía de afinidad de proteína A. El ADNc que codifica el dominio extracelular del EGFR humano (aminoácidos 1-637) se clonó en un vector de expresión de mamíferos que contiene una secuencia de bandera N-terminal.

65

Se determinaron las afinidades de unión para DL11f tanto como para Fab y el anticuerpo IgG. Para el ensayo Fab, el DL11 f FAB era el analito y se hizo fluir sobre un chip CM5 donde los diferentes ligandos - EGFR-Fc humano y HER3-Fc humano - se capturaron en primer lugar usando el Kit de Captura de Anticuerpo humano de BIAcore (Br-1008-39, Lot 10020611). Se inyectó una serie de diluciones 2 veces de DL11f Fab en un intervalo de 0,244-250 nM en PBS, Tween 20 al 0,05 % a una velocidad de caudal de 30 μ l/minuto a 25 °C. Entre cada inyección de los ligandos de fusión de Fc y el analito, se usó cloruro de magnesio 3M para regenerar el chip sensor (5 μ l a una velocidad de caudal de 10 μ l/min). Para determinar las constantes de afinidad del DL11f Fab a las proteínas de fusión de EGFR humano y de HER3 Fc, la señal de la célula de referencia se restó al sensograma de ensayo observado. Se calcularon las constantes cinéticas por ajuste de regresión no lineal de los datos de acuerdo con un modelo de unión de Langmuir 1:1 usando un software de evaluación de BIAcore (GE Healthcare), versión 4.1, suministrado por el fabricante. Dos réplicas de una concentración representativa de DL11f Fab (125 nM) dieron un ajuste y constantes cinéticas muy similares para todas las proteínas de fusión Fc. DL11f Fab se unía al EGFR-Fc humano con un valor de KD de 1,92 nM y al HER3-Fc humano con un valor de KD de 0,39 nM.

Se exploró una segunda condición experimental para obtener las cinéticas de unión de DL11f como IgG. En este punto, la IgG1 humana DL11f se inmovilizó en el chip sensor CM5 y se usaron como analito EGFR-ecd humano y HER3-ecd monoméricos. Se inyectó una dilución seriada dos veces de EGFR-ecd humano y HER3-ecd humano en un intervalo de 0,244-250 nM en PBS, Tween 20 al 0,05 % a una velocidad de caudal de 30 μ l/minuto a 25 °C. Se determinaron las constantes de afinidad como para el Fab. DL11f se unía al EGFR-edc humano y al HER3-edc humano con valores de K_D de 19,9 nM y 2,63 nM, respectivamente. En ambos experimentos, los presentes inventores observaron que el anticuerpo DL11f tiene una afinidad consistente 5-8 veces mayor por el HER3 que por el EGFR. Las afinidades más débiles encontradas en el experimento 2 para ambos receptores cuando se comparan con el experimento 1 pueden deberse a diferencias entre tener como analitos en solución el EGFR ecd o el HER3 ecd y el receptor como fusión Fc inmovilizado en el chip de célula de flujo. Es posible que estos receptores multi-dominio como ECD libre puedan encontrar más penalización entrópica para la energía de unión que cuando están en solución dando como resultado de esta manera una afinidad menor.

DL11b mostró afinidades de unión similares para el EGFR y el HER3 como DL11f en condiciones similares en un análisis Biacore separado.

DL3-11b y DL3-11f perdieron la capacidad de unirse específicamente al EGFR pero retenían la capacidad de unirse específicamente al HER3.

Inhibición de la proliferación celular de MDA-175

La inhibición de la proliferación celular de MDA-175 por DL11b y DL11f se investigó como se describe anteriormente. Tanto DL11b como DL11f inhibieron la proliferación de las células MDA-175 en un grado similar al del anticuerpo DL11. Figura 15. Las IC50 de DL11, DL11f y DL11b eran todas alrededor de 0,8-1,0 μ g/ml.

Inhibición de la fosforilación de HER32 inducida por herregulina en células MCF7.

Para determinar si el DL11 f podía inhibir la fosforilación de HER3 inducida por herregulina en células MCF7, se realizó un ensayo de fosforilación de receptor como se describe en el Ejemplo 6. Los resultados demostraron que el DL11f inhibió la fosforilación de HER3 inducida por herregulina de forma dependiente de la dosis. Figura 16.

Inhibición de la fosforilación del EGFR inducida por TGF- α en células EGFR-NR6 transfectadas estables

Para determinar si el DL11 f bloquea selectivamente la fosforilación del EGFR inducida por TGF- α , se realizó un ensayo de fosforilación de receptor como se describe en el Ejemplo 2. Los datos de la Figura 16 demuestran que el DL11f inhibe la fosforilación del EGFR inducida por TGF- α de forma dependiente de la dosis en este ensayo basado en células.

DL11 y DL11f inhiben el crecimiento tumoral en un modelo in vivo

Se usó un ensayo de modelo de trasplante de tumor HCA-7 para determinar el efecto de DL11 y DL11f en un crecimiento de tumor *in vivo*. El ensayo se realizó como sigue.

Se trasplantaron ratones beis SCID (Charles River Laboratories, San Diego, CA) subcutáneamente con piezas de tumor HCA-7. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 100 a 250 mm³, los ratones con tumores de tamaño similar se aleatorizaron en cohortes de tratamiento (n=9/grupo) como sigue: Vehículo (PBS), Pertuzumab (10 mg/kg), D1.5 (25 mg/kg), D1.5+DL3.6 (25 mg/kg cada uno), DL11 (25 mg/kg) o DL11f (25 mg/kg). Los tratamientos se administraron intraperitonealmente, empezando con una dosis de carga 2x (20 o 50 mg/kg) el día de la aleatorización y continuando semanalmente durante un total de tres tratamientos. Los tumores se midieron con calibradores dos veces a la semana durante la duración del estudio. Los ratones se mantuvieron en jaulas de micro aislamiento de roedores convencionales. Los controles ambientales para las habitaciones animales se ajustaron para mantener una temperatura de aproximadamente 21,11 °C (70 °F), una humedad relativa de aproximadamente

el 40 % - 60 % y un ciclo de aproximadamente 14 horas de luz/10 horas de oscuridad. Los ratones se mantuvieron de acuerdo con la ILAR Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, y el estudio se revisó y se aprobó por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) en Genentech.

- 5 DL11 y DL11f fueron igualmente eficaces reduciendo el volumen medio del tumor en este modelo de xenoinjerto. Figura 17.

DL11f es activo en un modelo de cáncer de pulmón no microcítico

- 10 Los anticuerpos se ensayaron en ratones con tumores establecidos derivados de la línea NSCLC humana H358 (ATCC CRL-5807, Manassas, Va.). Se inocularon 5×10^6 células H358 subcutáneamente con matrigel en ratones CB17 SCID. Los animales con tumores de tamaño similar se aleatorizaron en cohortes de tratamiento (n=9/grupo) como sigue: Vehículo (formulación tamponada de DL11f), D1.5 (25 mg/kg), DL3.11b (25 mg/kg), DL11f (30 mg/kg) o D1.5+DL3.11b (25 mg/kg cada uno). Los tratamientos se administraron intraperitonealmente, empezando con una dosis de carga 2x (50 o 60 mg/kg) el día de la aleatorización y continuando semanalmente durante un total de cuatro tratamientos. Los tumores se midieron con calibradores dos veces a la semana durante la duración del estudio.

- 20 Como se muestra en la Figura 18, el anticuerpo biespecífico DL11f es activo en este modelo de NSCLC y es más eficaz inhibiendo el crecimiento tumoral que una combinación de un anticuerpo específico anti-EGFR y uno específico anti-HER3 (D1.5+DL3.11b).

Ejemplo 10

Maduración de afinidad de DL3.6

- 25 Se maduró adicionalmente la afinidad de DL3.6 como se describe anteriormente dando como resultado anticuerpos anti-HER3 adicionales. DL3.6b mostró un aumento en la afinidad por su diana en comparación con el anticuerpo parental DL3.6. Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera del DL3.6b se muestran en SEQ ID NO: 17 y 13, respectivamente.

- 30 Como se muestra en las Figuras 19 y 20, DL3-11b, DL3.6 y DL3.6 b inhibían la fosforilación de HER3 inducida por HGR y la proliferación celular de MDA-175. Los ensayos se realizaron como se describe anteriormente.

Ejemplo 11

Actividad in vivo en un modelo de xenoinjerto Fadu, un modelo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello

- 40 Se ensayaron DL11f, un anticuerpo anti-EGFR disponible en el mercado y un anticuerpo anti-HE3 en ratones con tumores establecidos derivados de células Fadu (ATCC HTB-43, Manassas, Va.). Se inocularon subcutáneamente 5×10^6 células FaDu en ratones CB17 SCID. Los animales con tumores de tamaño similar se aleatorizaron en cohortes de tratamiento (n=9/grupo) como sigue: Vehículo (formulación tamponada de DL11f), anticuerpo anti-EGFR (25 mg/kg), anticuerpo anti-HER3 (50 mg/kg) y DL11f (25 mg/kg). Los tratamientos se administraron intraperitonealmente, empezando con una dosis de carga 2x (50 o 100 mg/kg respectivamente) el día de la aleatorización y continuando semanalmente durante un total de cuatro tratamientos. Los tumores se midieron con calibradores dos veces a la semana durante la duración del estudio.

- 50 Como se muestra en la Figura 21, DL11f es activo en el modelo de cáncer de cabeza y cuello FaDu y es más eficaz inhibiendo el crecimiento tumoral que un anticuerpo específico anti-EGFR o bien un anticuerpo específico anti-HER3.

Ejemplo 12

Actividad in vivo en un modelo de xenoinjerto BxPC3, un modelo pancreático dirigido por HER3

- 55 Se ensayaron DL11f, un anticuerpo anti-EGFR, pertuzumab y un anticuerpo anti-HER3 en ratones con tumores establecidos derivados de la línea celular pancreática BxPC3 (ATCC CRL-1687, Manassas, Va.). Se inocularon subcutáneamente 10×10^6 células CxPC3 en ratones CB17 SCID. Los animales con tumores de tamaño similar se aleatorizaron en cohortes de tratamiento (n=8/grupo) como sigue: Vehículo (formulación tamponada de DL11f), anticuerpo anti-EGFR (25 mg/kg), pertuzumab (25 mg/kg), anticuerpo anti-HER3 (50 mg/kg) y DL11f (25 mg/kg). Los tratamientos se administraron intraperitonealmente, empezando con una dosis de carga 2x (50 o 100 mg/kg) el día de la aleatorización y continuando semanalmente durante un total de cuatro tratamientos. Los tumores se midieron con calibradores dos veces a la semana durante la duración del estudio.

- 65 El DL11f es activo en el modelo de cáncer pancreático BxPC3 y es más eficaz retrasando el crecimiento tumoral que un anticuerpo específico anti-EGFR o bien un anticuerpo específico anti-HER3. (Figura 22).

Ejemplo 13Actividad in vivo en un modelo de xenoinjerto NSCLC Calu-3

5 Se ensayaron DL11f, un anticuerpo anti-EGFR disponible en el mercado y un anticuerpo anti-HER3 en ratones con tumores establecidos derivados de la línea de NSCLC Calu-3 (ATCC HTB-55, Manassas, Va.). Se inocularon subcutáneamente 5×10^6 células Calu-3 en ratones beis SCID. Los animales con tumores de tamaño similar se aleatorizaron en cohortes de tratamiento (n=9/grupo) como sigue: Vehículo (formulación tamponada de DL11f), anticuerpo anti-EGFR (25 mg/kg), anticuerpo anti-HER3 (25 mg/kg) y DL11f (25 mg/kg). Los tratamientos se
10 administraron intraperitonealmente, empezando con una dosis de carga 2x (50) el día de la aleatorización y continuando semanalmente (anti-HER3 bisemanalmente) durante un total de cuatro (ocho) tratamientos. Los tumores se midieron con calibradores dos veces a la semana durante la duración del estudio.

15 El DL11f es activo en el modelo de cáncer de pulmón no microcítico Calu-3 y es más eficaz retrasando el crecimiento tumoral que un anticuerpo específico anti-EGFR o bien un anticuerpo específico anti-HER3. (Figura 23).

Ejemplo 14Actividad in vivo en un modelo de xenoinjerto epidérmico A431

20 Se ensayaron DL11f, un anticuerpo anti-EGFR disponible en el mercado y un anticuerpo anti-HER3 en ratones con tumores establecidos derivados de la línea celular epidérmica A431 (ATCC CRL-2592, Manassas, Va.). Se inocularon subcutáneamente 5×10^6 células A431 en ratones beis SCID. Los animales con tumores de tamaño similar se aleatorizaron en cohortes de tratamiento (n=8/grupo) como sigue: Vehículo (formulación tamponada de DL11f), anticuerpo anti-EGFR (12,5 mg/kg), anti-HER3 (50 mg/kg) y DL11f (12,5 y 25 mg/kg). Los tratamientos se
25 administraron una vez intraperitonealmente el día de la aleatorización. Los tumores se midieron con calibradores dos veces a la semana durante la duración del estudio.

30 Debido al rápido aclarado del DL11f en comparación con el anticuerpo anti-EGFR en ratones, el DL11f se dosificó a concentración 2x en comparación con el anticuerpo anti-EGFR para lograr niveles de exposición comparables. Tomados en conjunto, el DL11f inhibe el crecimiento tumoral en el modelo de cáncer epidérmico A431 así como el anticuerpo específico anti-EGFR o bien un anticuerpo anti-EGFR. (Figura 24).

Ejemplo 15Actividad in vivo en ratones desnudos que llevan xenoinjertos del cáncer de mama derivado de paciente MAXF449

35 Se ensayaron DL11f, un anticuerpo anti-EGFR disponible en el mercado y un anticuerpo anti-HER3 en Oncotest GmbH, Feiburg, Alemania. Oncotest pasa tumores de pacientes, como el cáncer de mama MAXF 449, como xenoinjertos subcutáneos en ratones desnudos, siguiendo el trasplante directo de los tumores desde los pacientes donantes. De acuerdo con los protocolos de Oncotest, los animales con tumores de tamaño similar se aleatorizaron en cohortes de tratamiento (n=10/grupo) como sigue: DL11f (30 mg), anticuerpo anti-EGFR (30 mg/kg), anti-HER3 (60 mg/kg) y Vehículo (formulación tamponada de DL11f). Los tratamientos se administraron intraperitonealmente, empezando con una dosis de carga 2x (60 o 120 mg/kg) el día de la aleatorización y continuando semanalmente
40 durante un total de cuatro tratamientos.

45 El DL11f y el anti-HER3 inhiben el crecimiento tumoral en el modelo de cáncer de mama MAXF 44 mientras que el anticuerpo anti-EGFR no tiene efecto (Figura 25).

Ejemplo 16Actividad in vivo en un modelo de xenoinjerto de próstata DU145

50 Se ensayaron DL11f, un anticuerpo anti-EGFR disponible en el mercado y un anticuerpo anti-HER3 en Piedmont Research Center, Morrisville de acuerdo con los protocolos de Piedmont. Los animales con tumores de tamaño similar se aleatorizaron en cohortes de tratamiento (n=10/grupo) como sigue: DL11f (25 mg), anticuerpo anti-EGFR (25 mg/kg), anti-HER3 (50 mg/kg) y Vehículo (formulación tamponada de DL11f). Los tratamientos se administraron intraperitonealmente, empezando con una dosis de carga 2x (50 o 100 mg/kg respectivamente) el día de la aleatorización y continuando semanalmente durante un total de cuatro tratamientos. El DL11f es activo en el modelo
55 de cáncer de próstata DU145 y es más eficaz inhibiendo el crecimiento tumoral que un anticuerpo específico anti-EGFR o bien un anticuerpo específico anti-HER3. (Figura 26).

Ejemplo 17

65 Actividad in vivo en ratones desnudos que llevan xenoinjertos del cáncer de ovario derivado de paciente OVXF550

Se ensayaron DL11f, un anticuerpo anti-EGFR disponible en el mercado y un anticuerpo anti-HER3 en Oncotest GmbH, Feiburg, Alemania. Oncotest pasa tumores de pacientes, como el cáncer de ovario OVXF550, como xenoinjertos subcutáneos en ratones desnudos, siguiendo el trasplante directo de los tumores desde los pacientes donantes. De acuerdo con los protocolos de Oncotest, los animales con tumores de tamaño similar se aleatorizaron en cohortes de tratamiento (n=10/grupo) como sigue: DL11f (30 mg), anticuerpo anti-EGFR (30 mg/kg), anticuerpo anti-HER3 (60 mg/kg) y Vehículo (formulación tamponada de DL11f). Los tratamientos se administraron intraperitonealmente, empezando con una dosis de carga 2x (60 o 120 mg/kg) el día de la aleatorización y continuando semanalmente durante un total de cuatro tratamientos.

El DL11f es activo en el modelo de cáncer de ovario OVFX550 (Figura 27).

Ejemplo 18

DL11f media citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) in vitro e in vivo

DL11f media ADCC *in vitro*. Células A431, H292 (ATCC CRL-1848, Manassas, Va.), FaDu, BxPC3 y MDA 468 (ATCC HTB-132, Manassas, Va.) (todas de ATCC) se sembraron en placa en placas de 96 pocillos en presencia de las concentraciones de anticuerpo indicadas. Después de la preincubación durante 30 minutos a 37 °C se añadieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas y la incubación continuó durante 4 horas más a 37 °C. Después de 4 horas, las placas se centrifugaron y los sobrenadantes se cultivaron. La actividad LDH en los sobrenadantes se determinó de acuerdo con el procedimiento de ensayo de integridad de membrana homogéneo Promega CytoTox-One. Para determinar la citotoxicidad mediada por células en porcentaje se calcularon las absorbancias medias y se restó el fondo. Como se muestra en la Figura 28, DL11f mitiga ADCC en líneas celulares que expresan EGFR de forma dependiente de la dosis.

Se introdujo una sustitución de aminoácidos de N297A en el DL11f para eliminar la función efectora. N297 se requiere para la unión a FcRγ y/o al complemento. DL11f- N297A muestra una carencia de ADCC *in vitro*. Como se espera, la función inhibitoria del crecimiento de DL11f *in vitro* no se afecta por la mutación (Figura 29).

Se ensayaron DL11f y DL11f-N297A en ratones con tumores establecidos derivados de la línea celular de NSCLC H292 (ATCC CRL-1848, Manassas, Va.). Se inocularon subcutáneamente 5×10^6 células A431 en ratones CB17-SCID. Los animales con tumores de tamaño similar se aleatorizaron en cohortes de tratamiento (n=10/grupo) como sigue: Vehículo (formulación tamponada de DL11f), DL11f (6 mg/kg) y DL11f-N297A (6 mg/kg). Los tratamientos se administraron una vez intraperitonealmente el día de la aleatorización. Los tumores se midieron con calibradores dos veces a la semana durante la duración del estudio. Inicialmente, DL11f y DL11f-N297A inhibían el crecimiento tumoral de forma equivalente inhibiendo la ruta de señalización de HER. Pero conforme las dosis disminuían DL11f mostró actividad anti-tumoral prolongada en comparación con DL11f N297A debido a su capacidad de ADCC (Figura 30).

Ejemplo 19

DL11f es menos tóxico que cetuximab en macacos cangrejeros

Se llevó a cabo un estudio para determinar la toxicidad relativa de DL11f y cetuximab. Se asignaron macacos cangrejeros en tres Grupos y se dosificaron con DL11f o bien cetuximab (Capital Wholesale Drug, Columbus, OH) una vez a la semana durante seis semanas como sigue:

Grupo 1: Cetuximab 25 mg/kg;

Grupo 2: DL11f 25 mg/kg;

Grupo 3: DL11f 12,5 mg/kg.

Los 3 animales a los que se ha administrado cetuximab desarrollaron lesiones en la piel entre la 3ª y la 4ª dosis, indicando toxicidad. Este resultado se esperaba basándose en estudios en *Cynomolgus* llevados a cabo durante la aprobación de la FDA del cetuximab. Ninguno de los animales a los que se ha administrado DL11f mostró signos de toxicidad en este punto del estudio.

Uno de los animales que recibían la dosis de 25 mg/kg de DL11f desarrolló una lesión en la piel una semana después de la 6ª dosis. Esta lesión medía aproximadamente 4 cm x 7 cm y era muy ligera y se limitaba a un área pequeña en comparación con las lesiones observadas en los animales tratados con cetuximab.

Basándose en los análisis de los parámetros toxicocinéticos en este estudio de toxicología, la exposición al cetuximab y al DL11f era similar en los animales a los que se han administrado 25 mg/kg de cada compuesto de ensayo.

Se realizó un segundo estudio a mayor escala en las siguientes condiciones.

ES 2 572 728 T3

Se asignaron macacos cangrejeros en seis Grupos y se dosificaron, por administración intravenosa, bien con DL11f o bien un vehículo control una vez a la semana durante doce semanas como sigue:

- 5 Grupo 1: 10 monos (5 machos/5 hembras) Vehículo Control
- Grupo 2: 10 monos (5 machos /5 hembras) DL11f 5 mg/kg
- Grupo 3: 10 monos (5 machos /5 hembras) DL11f 15mg/kg
- Grupo 4: 10 monos (5 machos /5 hembras) DL11f 30 mg/kg
- Grupo 5: 4 monos (2 machos /2 hembras) Vehículo Control
- 10 Grupo 6: 4 monos (2 machos /2 hembras) DL11 f 30 mg/kg

Ninguno de los animales mostró ninguna toxicidad de la piel aparente durante el estudio o durante el periodo de recuperación que sigue a la dosificación final con el DL11f.

- 15 También se llevó a cabo un estudio de dosis única de administración intravenosa de PK en macacos cangrejeros. En este estudio, se dosificaron intravenosamente 3 monos por grupo con 1, 10 o 30 mg/kg de DL11f. La PK por encima del intervalo de dosis explorado era no lineal, coherente con un aclarado saturable como se ha visto con otros anticuerpos que marcan como diana el EGFR.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Genentech, Inc. *et al.*
- <120> Anticuerpos anti-HER
- 25 <130> P4203R1 WO
- <150> 61/210562
- <151> 20-03-2009
- 30 <160> 79
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 35 <211> 214
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 40 <223> sintético
- <400> 1

ES 2 572 728 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 2
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

5

10

ES 2 572 728 T3

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gly Asn
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Tyr Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His
 225

ES 2 572 728 T3

<210> 3
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Thr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

ES 2 572 728 T3

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

5 <210> 4
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sintético

<400> 4

ES 2 572 728 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Leu Ala Thr Asp
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 5
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

ES 2 572 728 T3

<220>
<223> sintético

<400> 5

5

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Leu Gly Asp Ser
           20           25           30

Glu Asn Gly Tyr Ala Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
           35           40           45

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
           85           90           95

Ala Ala Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
           100          105          110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
           115          120          125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
           130          135          140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145          150          155          160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
           165          170          175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
           180          185          190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
           195          200          205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
           210          215          220
    
```

ES 2 572 728 T3

<210> 6

<211> 220

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

10 <400> 6

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser
20 25 30

His Asp Gly Thr Pro Trp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Ser Thr Phe Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

ES 2 572 728 T3

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 7
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

<400> 7

ES 2 572 728 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Phe Pro Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ala Pro Thr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 8
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

ES 2 572 728 T3

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Ala Ser Asp
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

ES 2 572 728 T3

<210> 9
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Gly Ser Asp
          20           25           30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Pro Glu Pro Tyr
          85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110
    
```

ES 2 572 728 T3

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

- <210> 10
- <211> 214
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> sintético
- 10 <400> 10

ES 2 572 728 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ala Ser Asp
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Pro Glu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 11
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>

ES 2 572 728 T3

<223> sintético

<400> 11

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Leu Ala Thr Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

5

<210> 12
<211> 228

ES 2 572 728 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> sintético

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Gly Asp
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly

ES 2 572 728 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ala Thr Asp
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 14
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

5

10

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Gly Asp
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His
 225

ES 2 572 728 T3

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> sintético

10

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Leu Ala Thr Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

ES 2 572 728 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 16
<211> 228
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 16

5

10

ES 2 572 728 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Asp
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His
 225

ES 2 572 728 T3

<210> 17
<211> 228
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> sintético

10

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gly Asp
20 25 30

ES 2 572 728 T3

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His
 225

<210> 18
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 18

5

10

ES 2 572 728 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Leu Phe Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Ala
 85 90 95
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 19
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 19

5

10

ES 2 572 728 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Gly Asp
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ser Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His
 225

5 <210> 20
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 572 728 T3

<220>
<223> sintético

<400> 20

5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Gly Asp
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ser Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His
 225

<210> 21
<211> 218
<212> PRT

10

ES 2 572 728 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

5

<400> 21

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Val Trp Gly Gly
          20           25           30

Tyr Ile Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
          35           40           45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50           55           60

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu
          85           90           95

Pro Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105          110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
          115          120          125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
          130          135          140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
          145          150          155          160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
          165          170          175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
          180          185          190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
          195          200          205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215
    
```

10

<210> 22

<211> 218

ES 2 572 728 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> sintético

<400> 22

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Gln Ser Ile Ala Gly Ala
          20           25           30

Tyr Tyr Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
          35           40           45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Tyr Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
          50           55           60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65           70           75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu
          85           90           95

Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105          110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
          115          120          125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130          135          140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145          150          155          160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
          165          170          175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
          180          185          190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
          195          200          205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215
    
```

10 <210> 23
 <211> 218
 <212> PRT

ES 2 572 728 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

5

<400> 23

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Trp Ala Ala
20 25 30

Tyr Phe Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu
85 90 95

Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

ES 2 572 728 T3

<210> 24
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

<400> 24

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Thr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 25
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> sintético

20

<400> 25

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gly Asn
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

ES 2 572 728 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Tyr Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 26
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sintético

<400> 26

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Leu Ala Thr Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

15 <210> 27
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> sintético

<400> 27

ES 2 572 728 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Gly Asp
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 29
- <211> 108
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> sintético
- <400> 29

ES 2 572 728 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ala Thr Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 30
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> sintético

10

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Gly Asp
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

ES 2 572 728 T3

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 31
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> sintético

10

<400> 31

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Leu Ala Thr Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

15 <210> 32
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>

ES 2 572 728 T3

<223> sintético

<400> 32

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

5

<210> 33

<211> 121

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

15

<400> 33

ES 2 572 728 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gly Asp
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 34
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético

<400> 34

ES 2 572 728 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Gly Asp
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ser Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 121
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético
 10

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

ES 2 572 728 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Gly Asp
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ser Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 36
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético

<400> 36

ES 2 572 728 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Gln Ser Ile Ala Gly Ala
 20 25 30

Tyr Tyr Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Tyr Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu
 85 90 95

Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 38
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

<400> 38

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Trp Ala Ala
 20 25 30

Tyr Phe Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

ES 2 572 728 T3

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu
85 90 95

Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

5 <210> 39
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sintético

<400> 39

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Leu Phe Tyr
20 25 30

Gly Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Ala
85 90 95

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

15 <210> 40
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> sintético

<400> 40

ES 2 572 728 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Leu Ala Thr Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 41
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético

<400> 41

ES 2 572 728 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Leu Gly Asp Ser
 20 25 30

Glu Asn Gly Tyr Ala Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Ala Ala Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

- <210> 42
- <211> 114
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> sintético
- 10 <400> 42

ES 2 572 728 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser
 20 25 30

His Asp Gly Thr Pro Trp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val
 50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Ser Thr Phe Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

<210> 43
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

<400> 43

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Phe Pro Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

ES 2 572 728 T3

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ala Pro Thr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 44
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> sintético
 <400> 44

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Ala Ser Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

15 <210> 45
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> sintético
 <400> 45

ES 2 572 728 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Gly Ser Asp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

5 <210> 46
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético

<400> 46

ES 2 572 728 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ala Ser Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Pro Glu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 47
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético
 <400> 47

Phe Thr Gly Asn Trp Ile His
 1 5

15 <210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintético
 <400> 48

Leu Ser Gly Asp Trp Ile His
 1 5

25 <210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> sintético

<400> 49

Val Gly Glu Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Asp
1 5 10

5

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

15 <400> 50

Leu Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp
1 5 10

20 <210> 51

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> sintético

<400> 51

Val Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp
1 5 10

30

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> sintético

<400> 52

40

Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Tyr Glu Ala Ala Met Asp Tyr
1 5 10

45 <210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> sintético

<400> 53

Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

10 <400> 54

Asp Leu Ala Thr Asp Val Ala
1 5

15 <210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintético

<400> 55

Asn Ile Ala Thr Asp Val Ala
1 5

25 <210> 56
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintético

<400> 56

Ser Ala Ser Phe
1

35
 40 <210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

45 <400> 57

Ser Glu Pro Glu Pro Tyr Thr
1 5

50 <210> 58
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> sintético

ES 2 572 728 T3

<400> 58

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético
 <400> 59

Phe Ser Gly Asp Trp Ile His
 1 5

15 <210> 60
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético
 25 <400> 60

Val Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp
 1 5 10

30 <210> 61
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 572 728 T3

<220>
<223> sintético

<400> 61

5

Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> sintético

15

<400> 62

Phe Thr Gly Asp Trp Ile His
1 5

20

<210> 63
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> sintético

<400> 63

30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 572 728 T3

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

<210> 64
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

<400> 64

ES 2 572 728 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Gly Asp
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 66
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Asn

ES 2 572 728 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Gly Asp
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Ser Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ala Arg Val Ser Tyr Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 68
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético

<400> 68

ES 2 572 728 T3

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

5

<210> 69
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> sintético
 <400> 69

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Thr Gly Asp
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

ES 2 572 728 T3

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

5 <210> 70
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético

15 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (19)..(23)
 <223> n es A, C, G o T

20 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> N es G o T

25 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (25)..(27)
 <223> n es A, C, G o T

30 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> N es A o G

35 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> n es A o G

<400> 70
 acttattact gtcagcaann nnnnnnnst ccttacacgt tcgga 45

40 <210> 71
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético
 <220>
 <221 > misc_feature
 5 <222> (19)..(21)
 <223> n es A, C, G o T
 <220>
 <221 > misc_feature
 10 <222> (25)..(27)
 <223> n es A, C, G o T
 <220>
 <221 > misc_feature
 15 <222> (28)..(28)
 <223> n es A o G
 <220>
 <221 > misc_feature
 20 <222> (29).. (29)
 <223> n es G o C
 <400> 71
 25 acttattact gtcagcaann ntacnnnnnt ccttacacgt tcgga 45
 <210> 72
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221 > misc_feature
 35 <222> (19)..(19)
 <223> n es A, G o T
 <220>
 <221 > misc_feature
 40 <222> (22)..(30)
 <223> n es A, C, G o T
 <400> 72
 45 acttattact gtcagcaang gnnnnnnnnn ccttacacgt tcgga 45
 <210> 73
 <211> 45
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <220>
 <221 > misc_feature
 55 <222> (19)..(19)
 <223> n es G o T
 <220>
 <221 > misc_feature
 60 <222> (20)..(20)
 <223> n es A o C
 <220>
 <221 > misc_feature
 65

<222> (22)..(23)
 <223> n es A, C, G o T

5

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> n es G o T

10

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (25)..(39)
 <223> n es A, C, G o T

15

<400> 73
 acttattact gtcagcaann tnnnnnnnnn ccttacacgt tcgga 45

20

<210> 74
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> sintético

30

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (19)..(23)
 <223> n es A, C, G o T

35

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> n es G o T

40

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (25)..(29)
 <223> n es A, C, G o T

45

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> n es G o T

50

<400> 74
 acttattact gtcagcaann nnnnnnnnnn ccttacacgt tcgga 45

55

<210> 75
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> sintético

65

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n es A, G o T

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (22)..(26)
 <223> n es A, C, G o T

<220>

<221 > misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> n es G o T

5

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> n es A o G

10

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es G o C

15

<400> 75
 acttattact gtcagcaang gnnnnnnnt ccttacacgt tcgga 45

<210> 76
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> sintético

25

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n es G o T

30

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n es A o C

35

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> n es A, C, G o T

40

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> n es G o T

45

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> n es A, C, G o T

50

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> n es G o T

55

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> n es A o G

60

<220>
 <221 > misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es G o C

65

<400> 76

ES 2 572 728 T3

acttattact gtcagcaann tnnnnnnnt ccttacacgt tcgga 45

5 <210> 77
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sintético

<400> 77
tctgtgaca aaactcacag tggcgggtgc tctggt 36

15 <210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> sintético

<400> 78

Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5

25 <210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> sintético

35 <400> 79

Ser Tyr Pro Thr Pro Tyr Thr
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio de cadena variable ligera (V_L), en el que el V_H y el V_L se emparejan juntos para formar un único dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3, en donde el anticuerpo comprende:
- 10 (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de LSGDWIH (SEQ ID NO: 48);
 (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VGEISAAGGYTD (SEQ ID NO: 51); y
 (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARESRVSFEAAMDY (SEQ ID NO: 53); y
 (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de NIATDVA (SEQ ID NO: 55);
 (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASF (SEQ ID NO: 56); y
 (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEPEPYT (SEQ ID NO: 57).
- 15 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la toxicidad dermatológica del anticuerpo es menor que la toxicidad dermatológica de cetuximab medida en macacos cangrejeros.
3. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2 que es un anticuerpo biespecífico.
- 20 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende dos dominios de unión a antígeno que tienen la misma especificidad de unión, en donde cada dominio de unión a antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que se emparejan juntos para formar un único dominio de unión a antígeno que se une específicamente al EGFR y al HER3.
- 25 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde la toxicidad:
- (a) se retrasa o se reduce su gravedad en un modelo *in vivo* en comparación con un antagonista del EGFR;
- o
- 30 (b) se retrasa o se reduce su gravedad *in vivo* en un macaco cangrejero al que se ha administrado el anticuerpo en comparación con un macaco cangrejero al que se ha administrado una cantidad igual del antagonista de EGFR cetuximab.
- 35 6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo:
- (i) inhibe una actividad biológica de al menos uno de EGFR y HER3;
 (ii) inhibe una actividad biológica tanto de EGFR como de HER3;
 (iii) inhibe que el EGF se una al EGFR;
 (iv) inhibe la fosforilación del EGFR inducida por TGF- α ; o
 (v) inhibe el crecimiento de células tumorales.
- 40 7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo:
- (i) se une al dominio III del EGFR;
 (ii) se une al dominio III del HER3;
 (iii) se une al dominio III del EGFR y al dominio III del HER3;
 (iv) se une al EGFR y al HER3 con una K_d de menos de 10^{-6} M;
 (v) se une al EGFR con una K_d de menos de 10^{-6} M y se une al HER3 con una K_d de menos de 10^{-7} M; o
 (vi) no se une específicamente al HER2 o al HER4.
- 50 8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende:
- (a) un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; o
- 55 (b) un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; o
 (c) un dominio variable de cadena pesada como en (a) y un dominio variable de cadena ligera como en (b).
- 60 9. El anticuerpo de la reivindicación 8, que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 30, una secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 29 o una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 30 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 29.
- 65 10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 14 y una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 13.

11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 de longitud completa.
- 5 12. El anticuerpo de la reivindicación 11, en donde el anticuerpo muestra actividad ADCC.
13. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 13.
- 10 15. Un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 14 de tal manera que se produzca el anticuerpo.
16. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un agente citotóxico.
- 15 17. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
18. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso como medicamento.
- 20 19. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer.
- 25 20. El anticuerpo de la reivindicación 19 para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, en donde el cáncer comprende células que expresan EGFR y HER3.
21. El anticuerpo de la reivindicación 19 para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata y cáncer de pulmón no microcítico.
- 30 22. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso inhibiendo (i) una actividad biológica del EGFR en un sujeto, (ii) una actividad biológica del HER3 en un sujeto o (iii) una actividad biológica del EGFR y el HER3 en un sujeto como terapia.
- 35 23. La formulación farmacéutica de la reivindicación 17, que comprende adicionalmente (a) un agente quimioterapéutico o (b) un segundo compuesto que es irinotecán (CPT-11), leucovorina, 5-fluorouracilo (5-FU), cisplatino, paclitaxel o carboplatino.
- 40 24. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 en combinación con (a) un agente quimioterapéutico, (b) un segundo compuesto que es irinotecán (CPT-11), leucovorina, 5-fluorouracilo (5-FU), cisplatino, paclitaxel o carboplatino o (c) terapia de radiación.

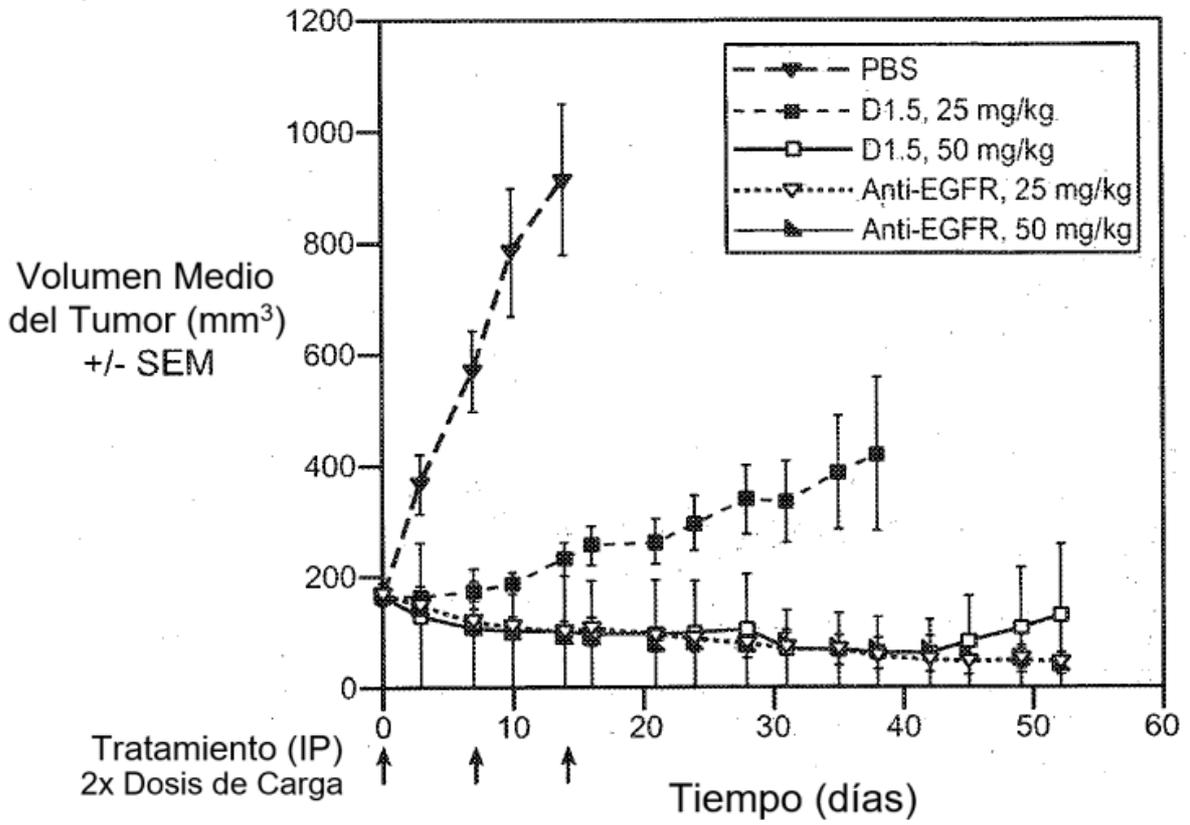


FIG. 1

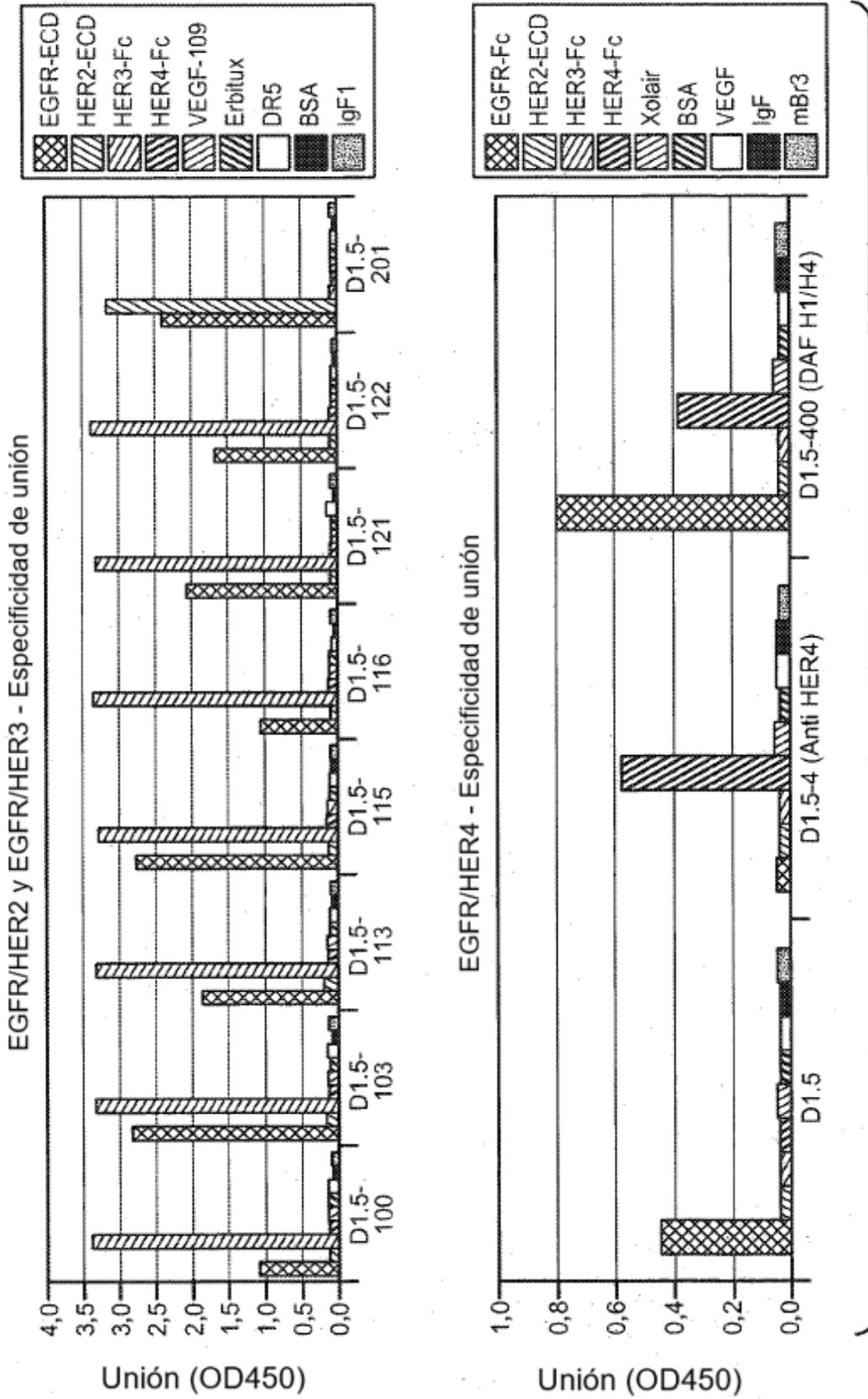


FIG. 2

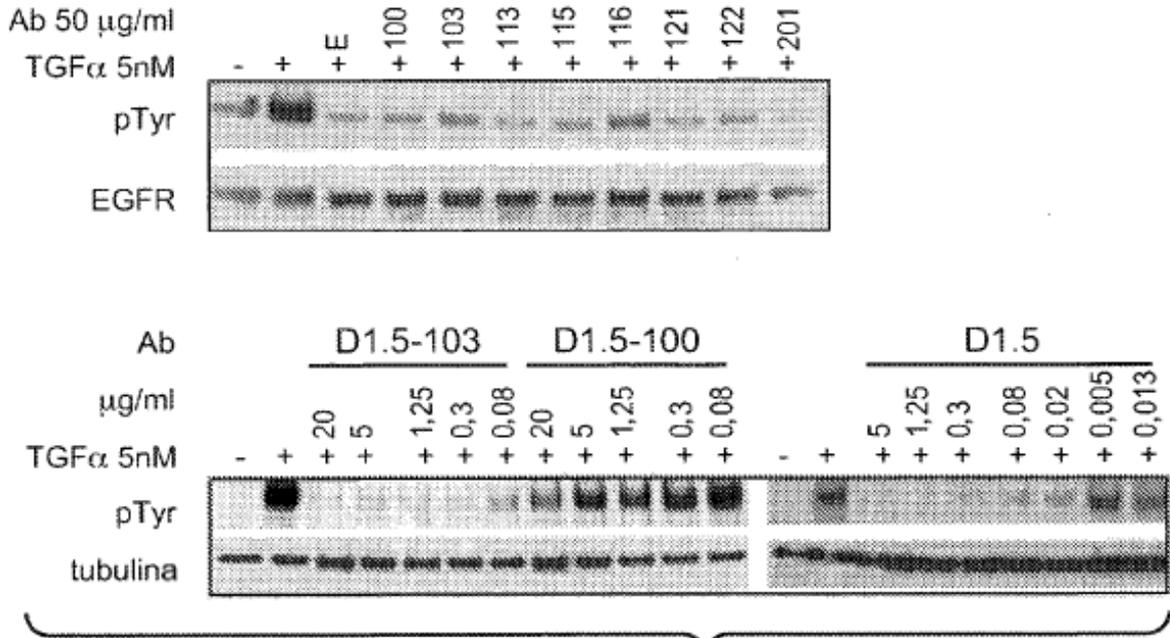


FIG. 3

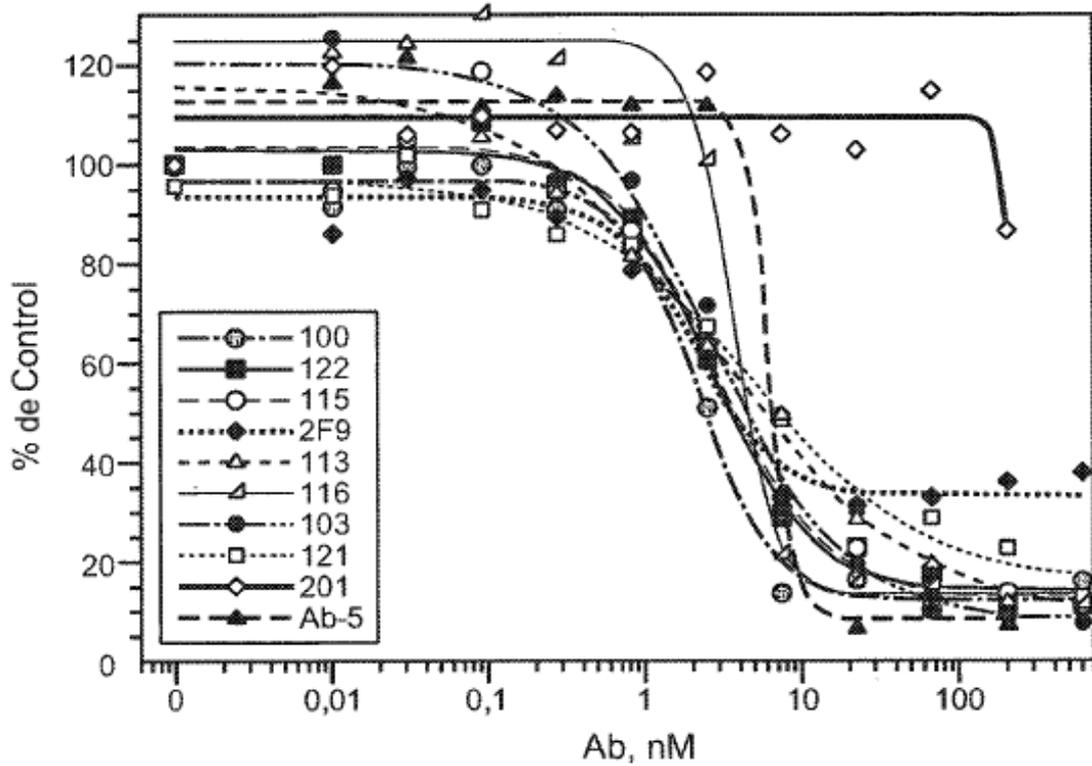


FIG. 4

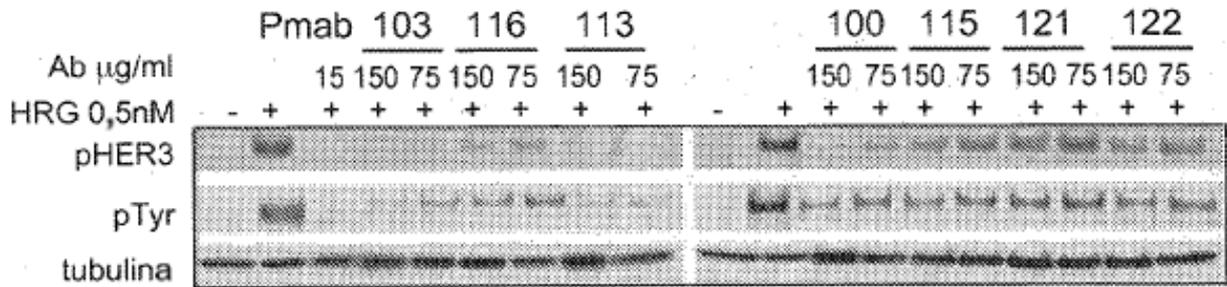


FIG. 5

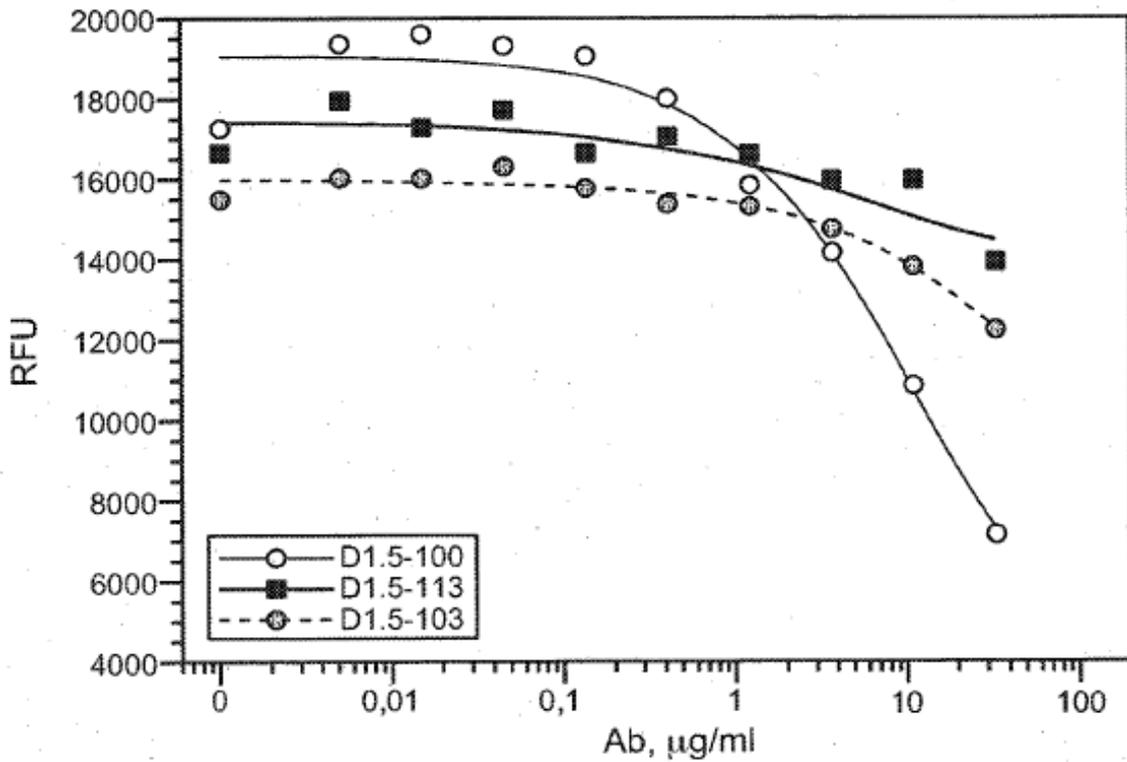
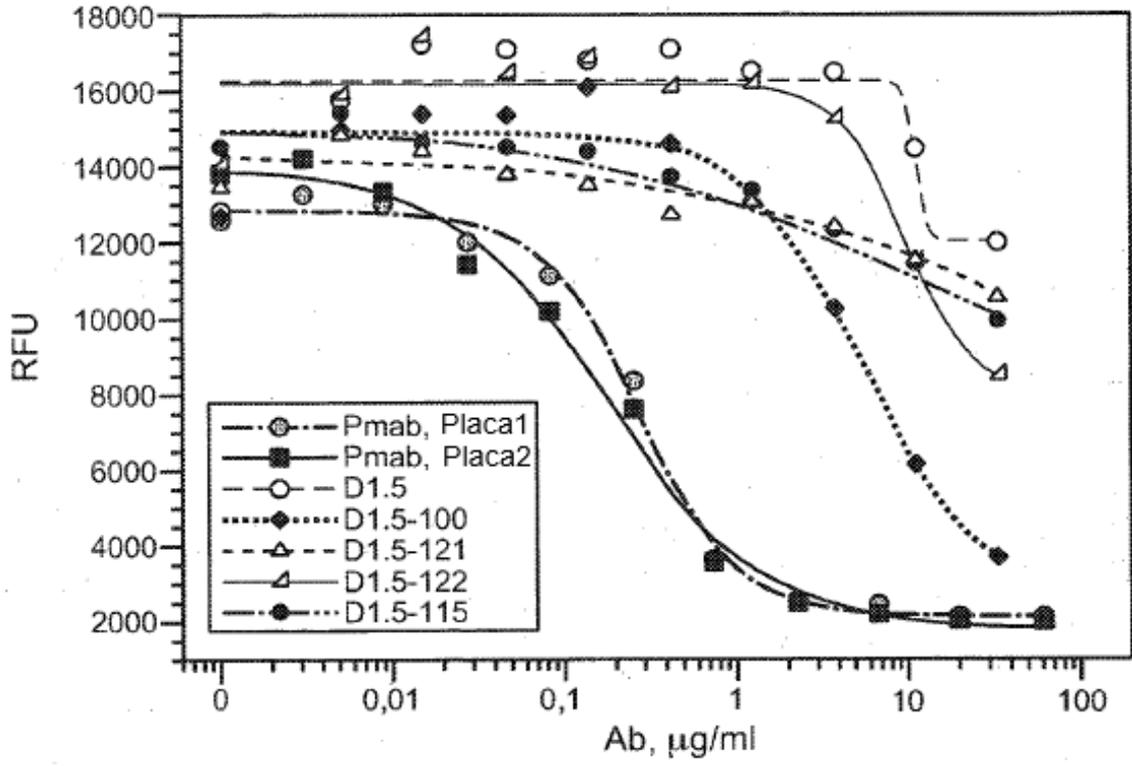
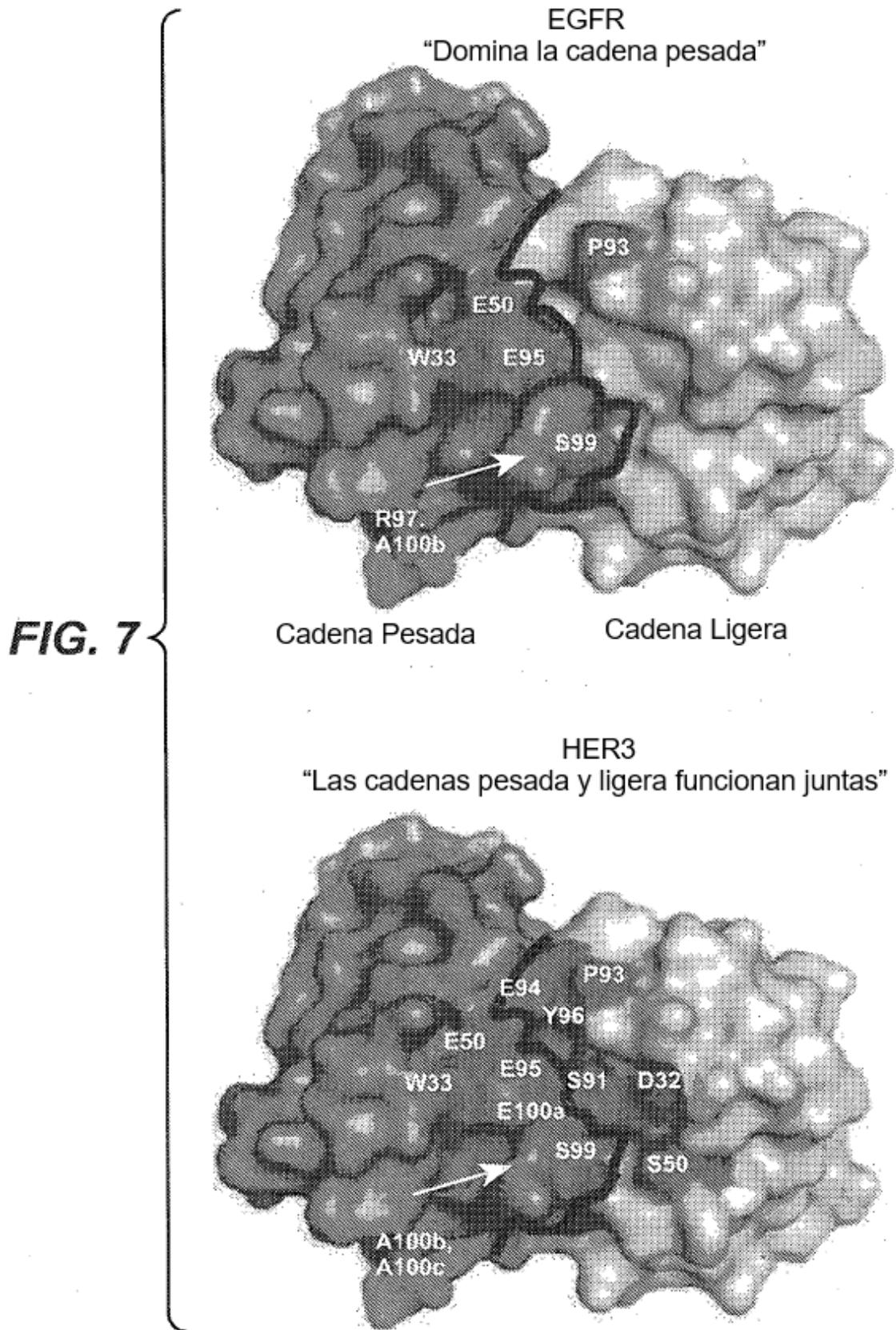


FIG. 6



Estrategia de Maduración de Afinidad de Anticuerpos

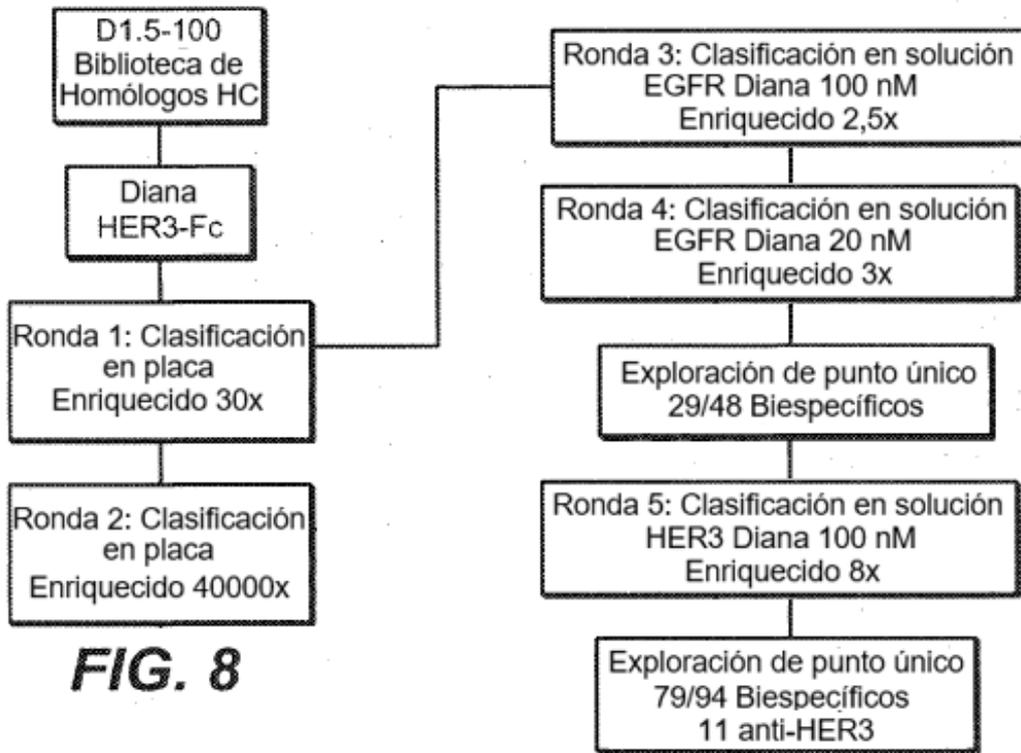


FIG. 8

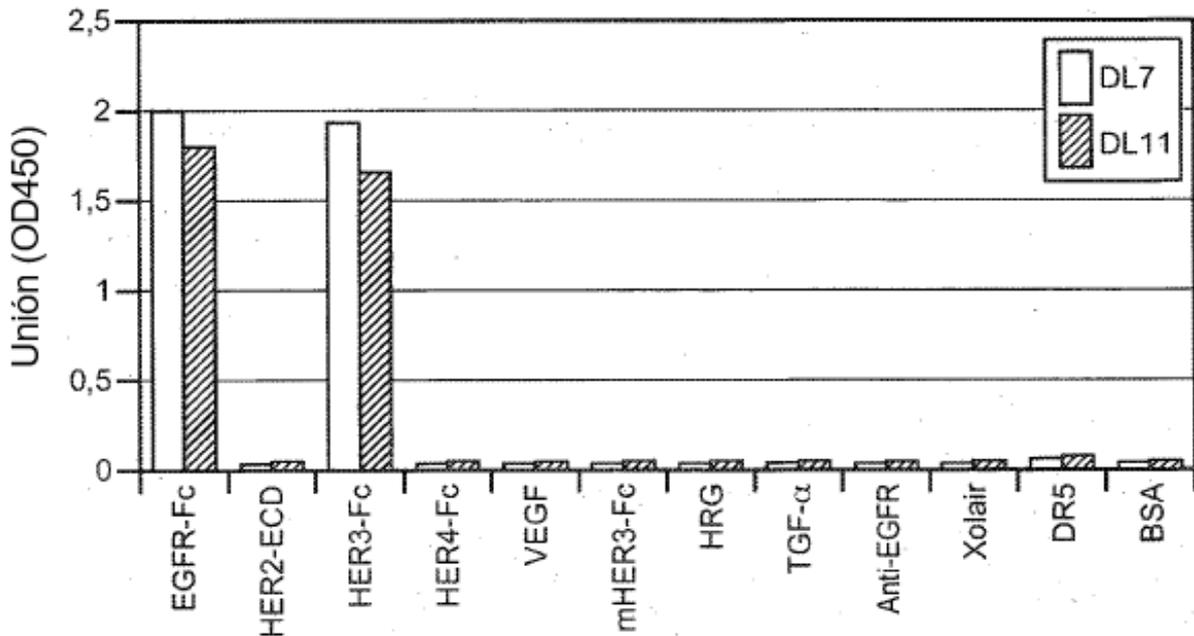


FIG. 9

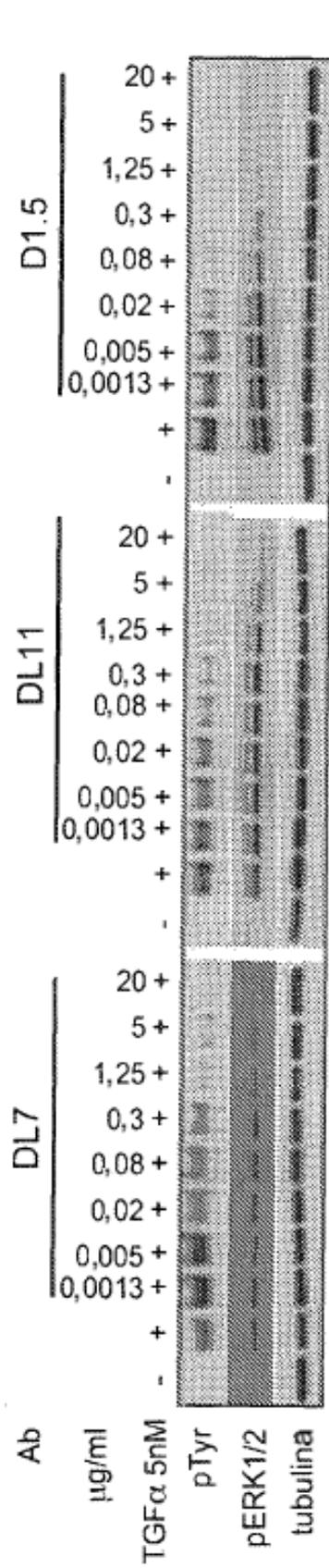


FIG. 10A

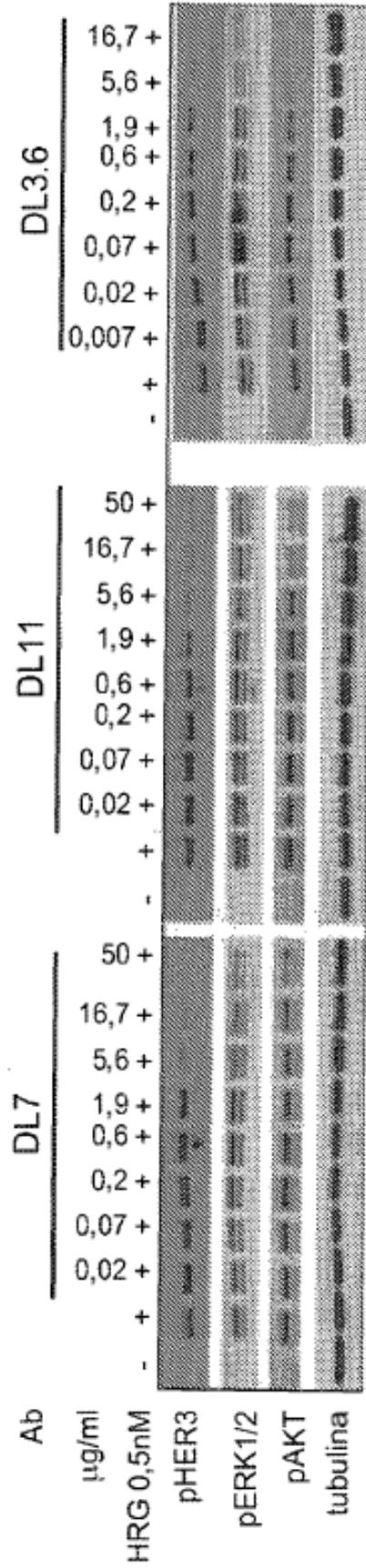


FIG. 10B

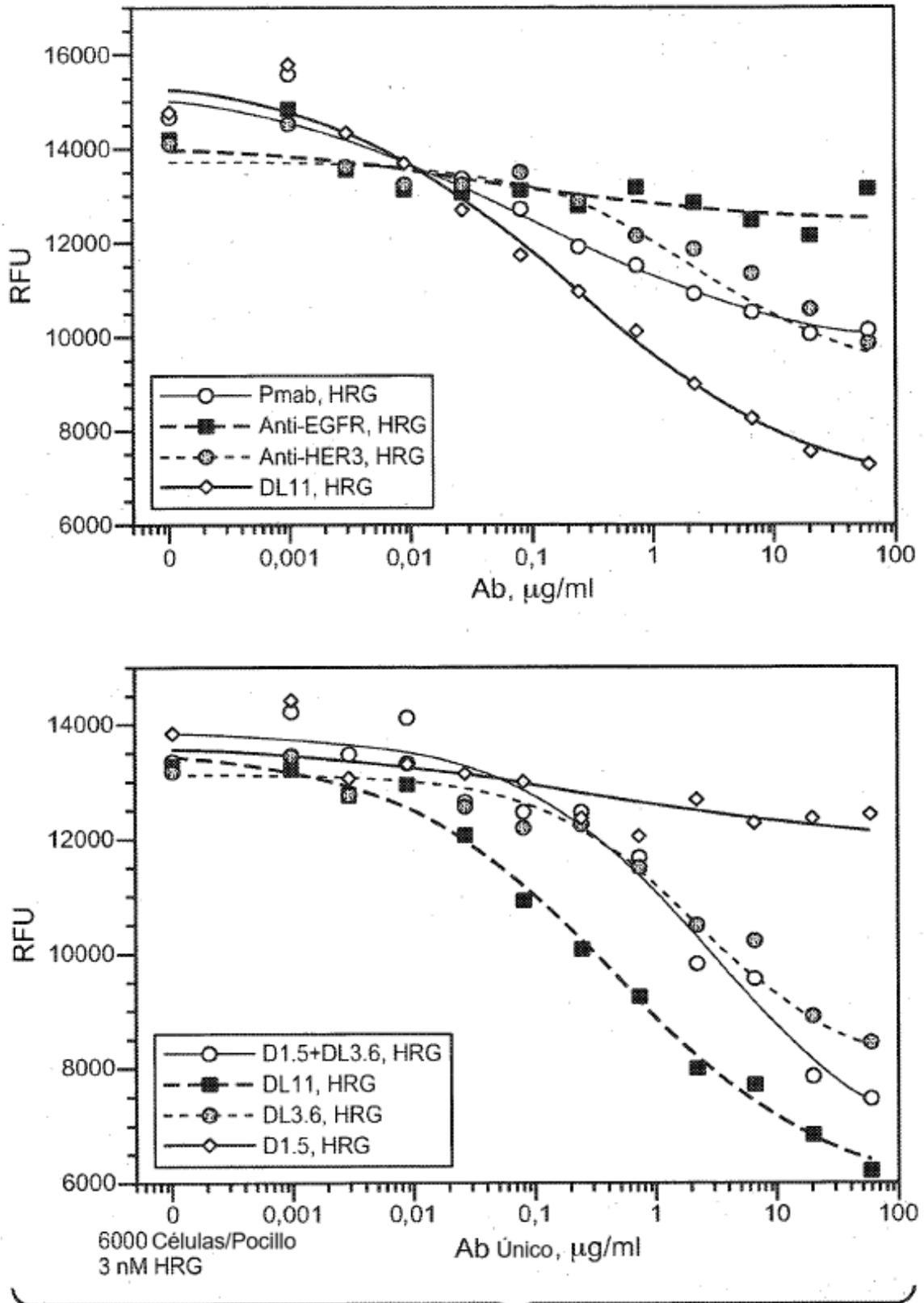


FIG. 11A

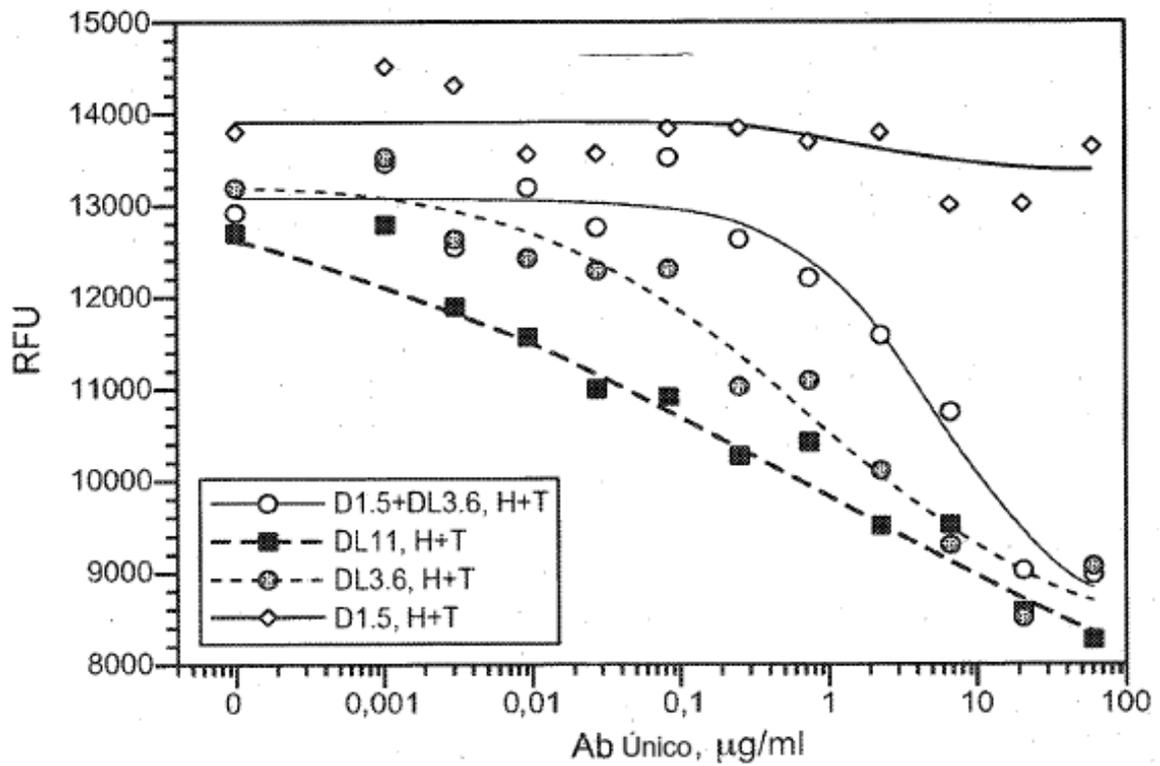
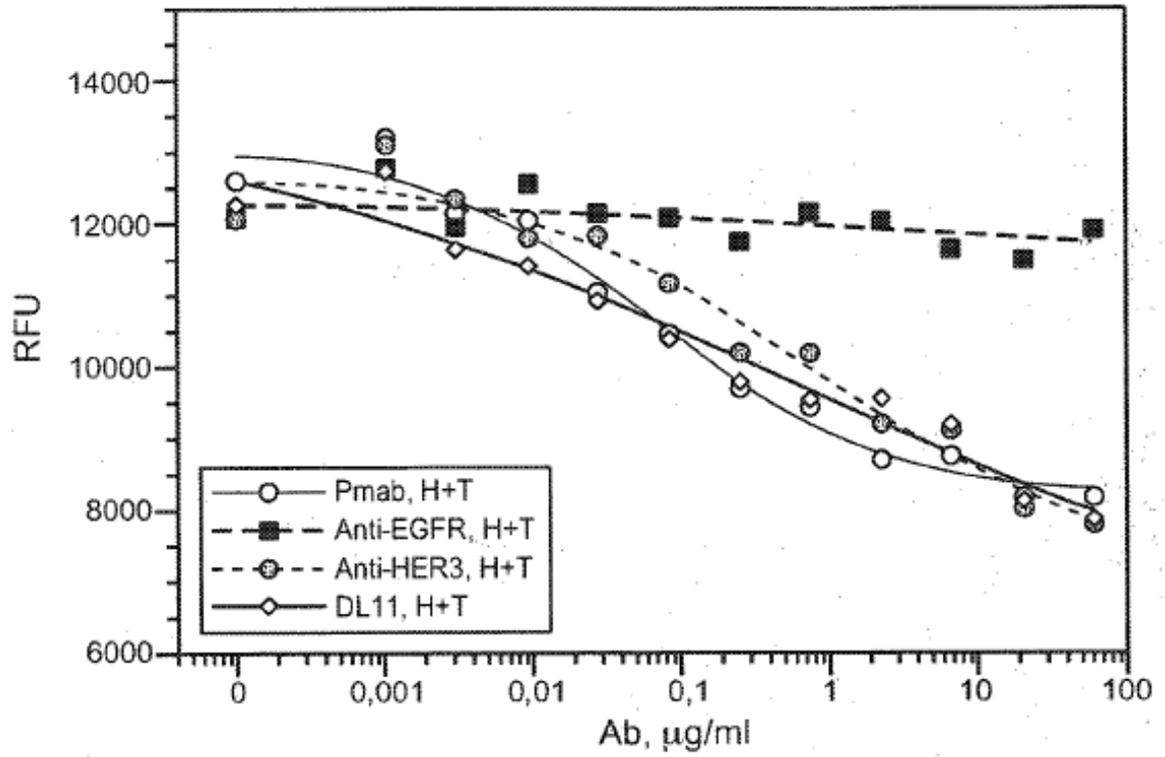


FIG. 11B

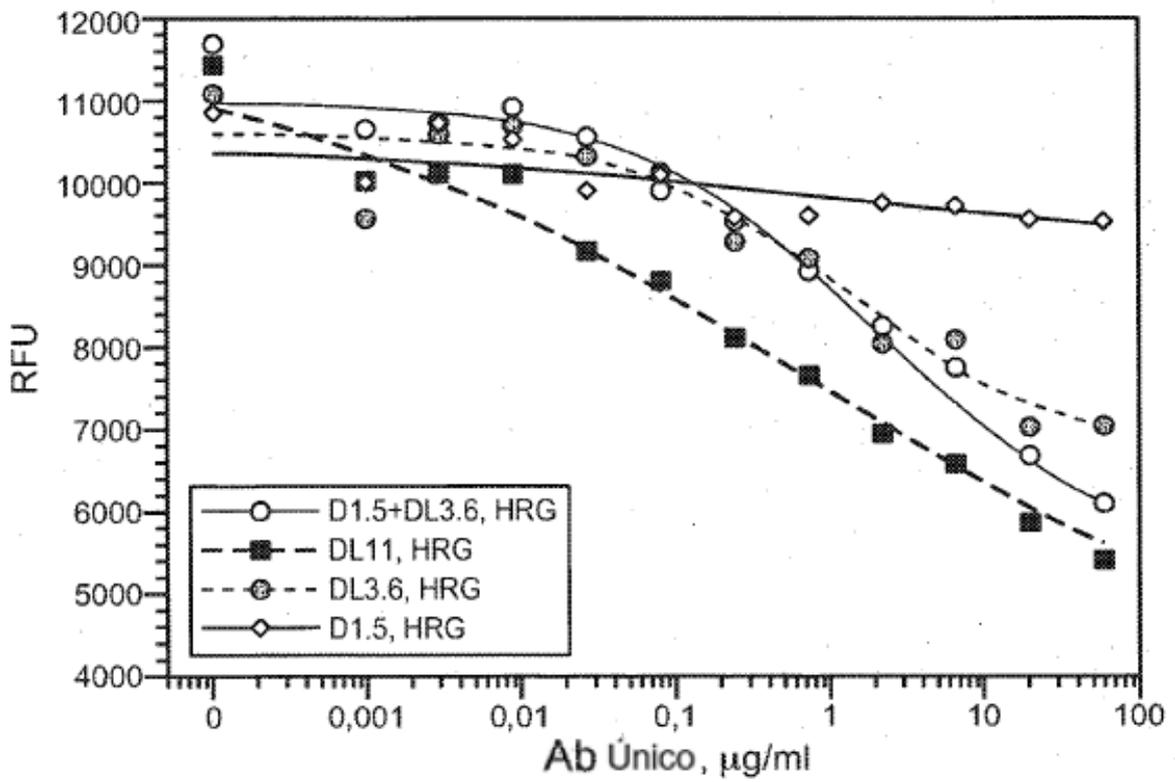
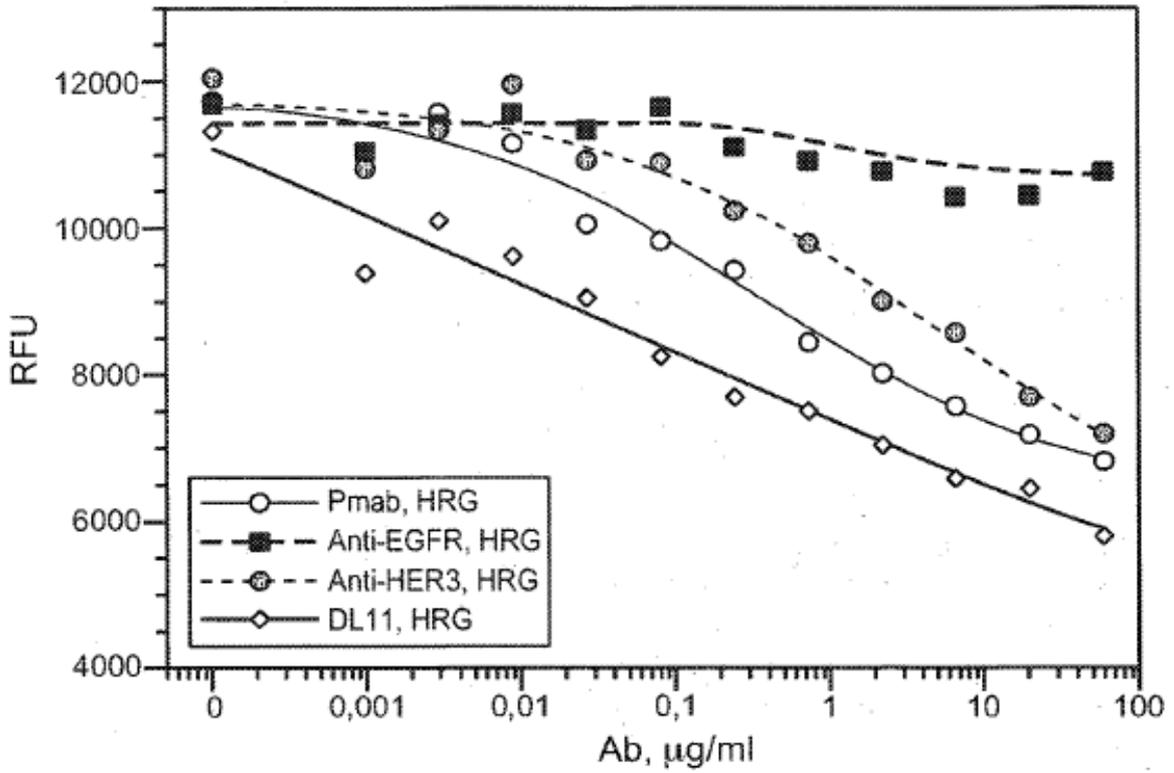


FIG. 12A

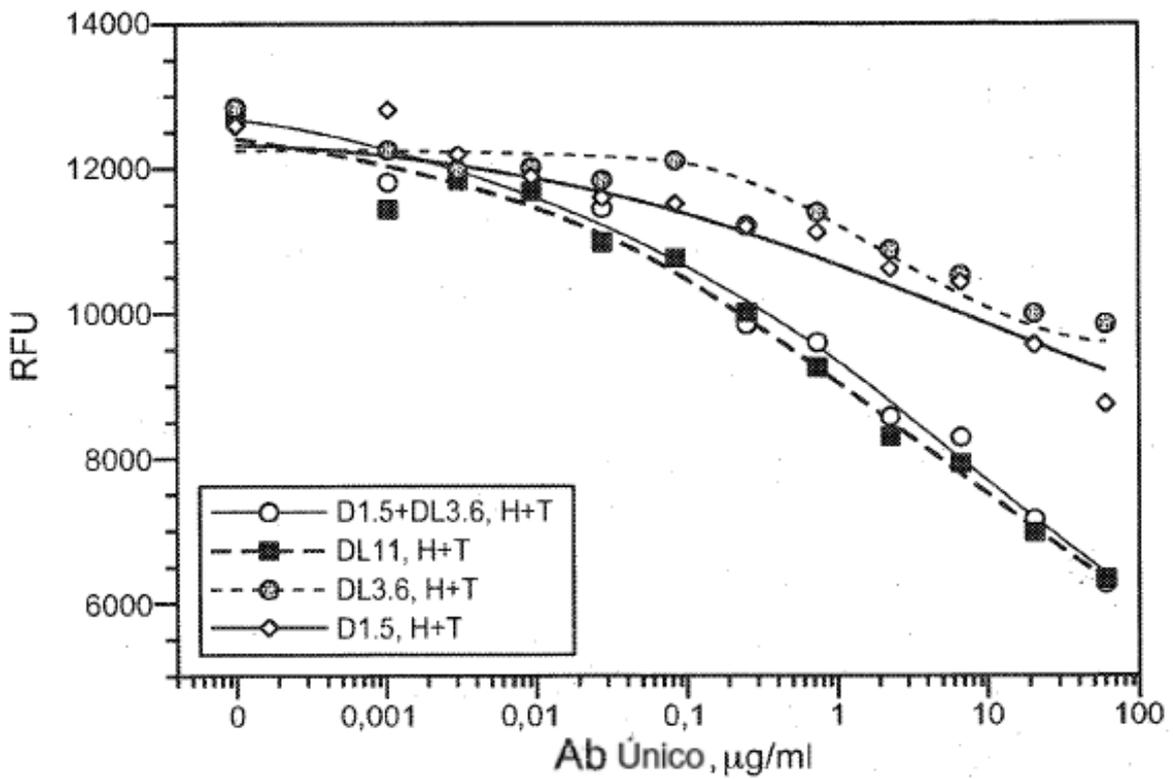
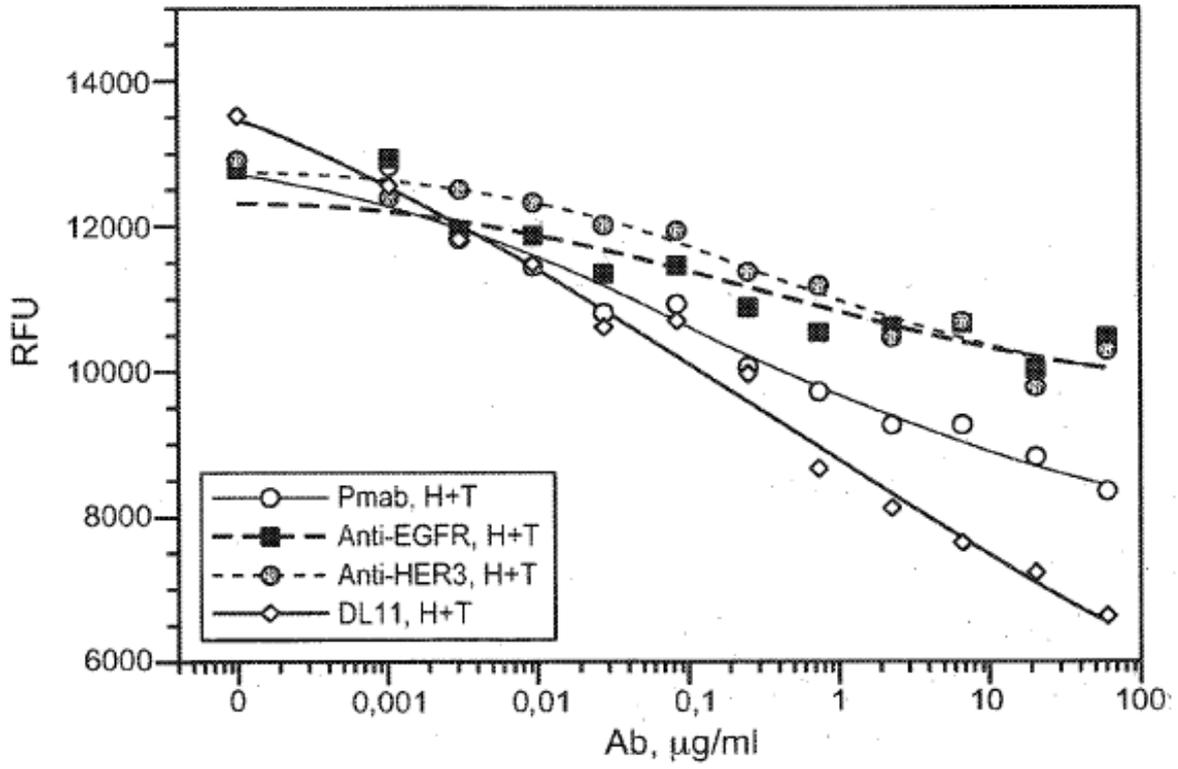


FIG. 12B

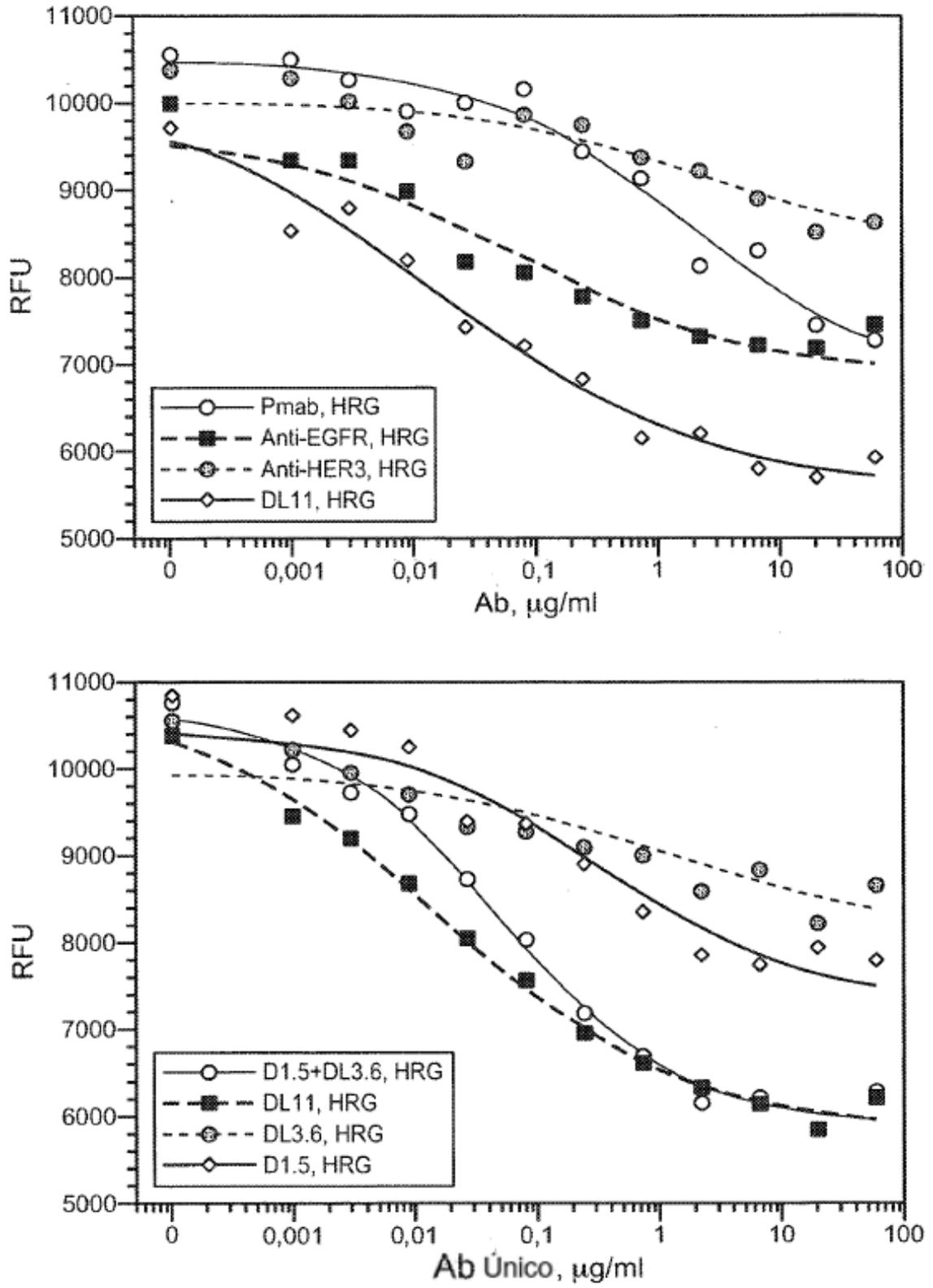


FIG. 13

Estrategia de Maduración de Afinidad Biespecífica EGFR-HER2 D1.5-201

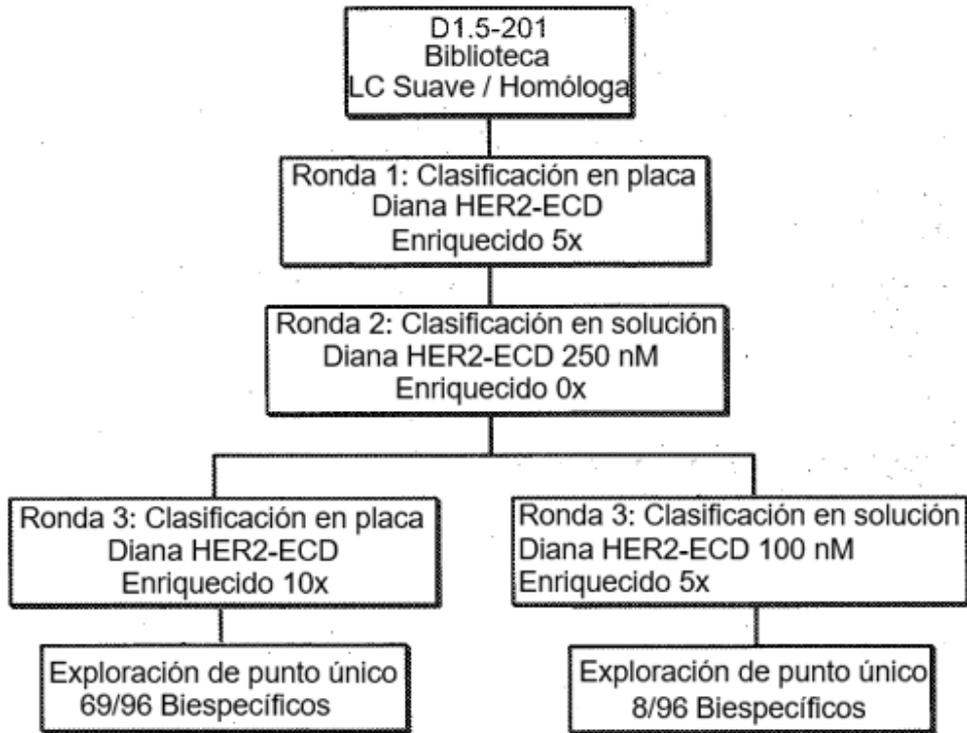


FIG. 14

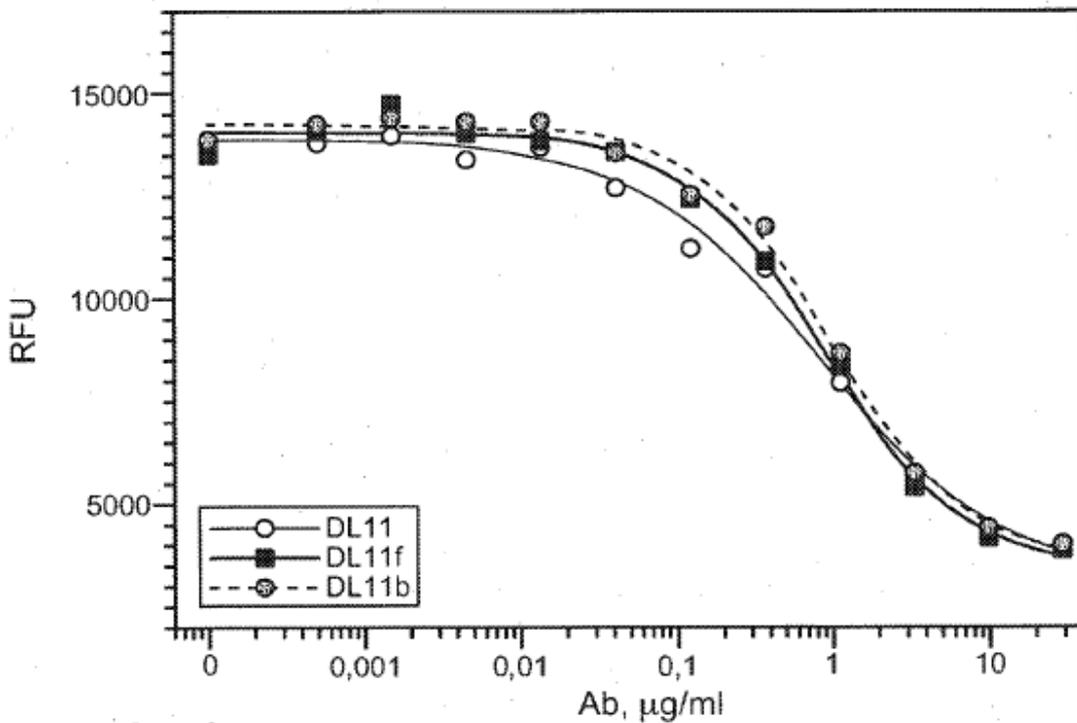


FIG. 15

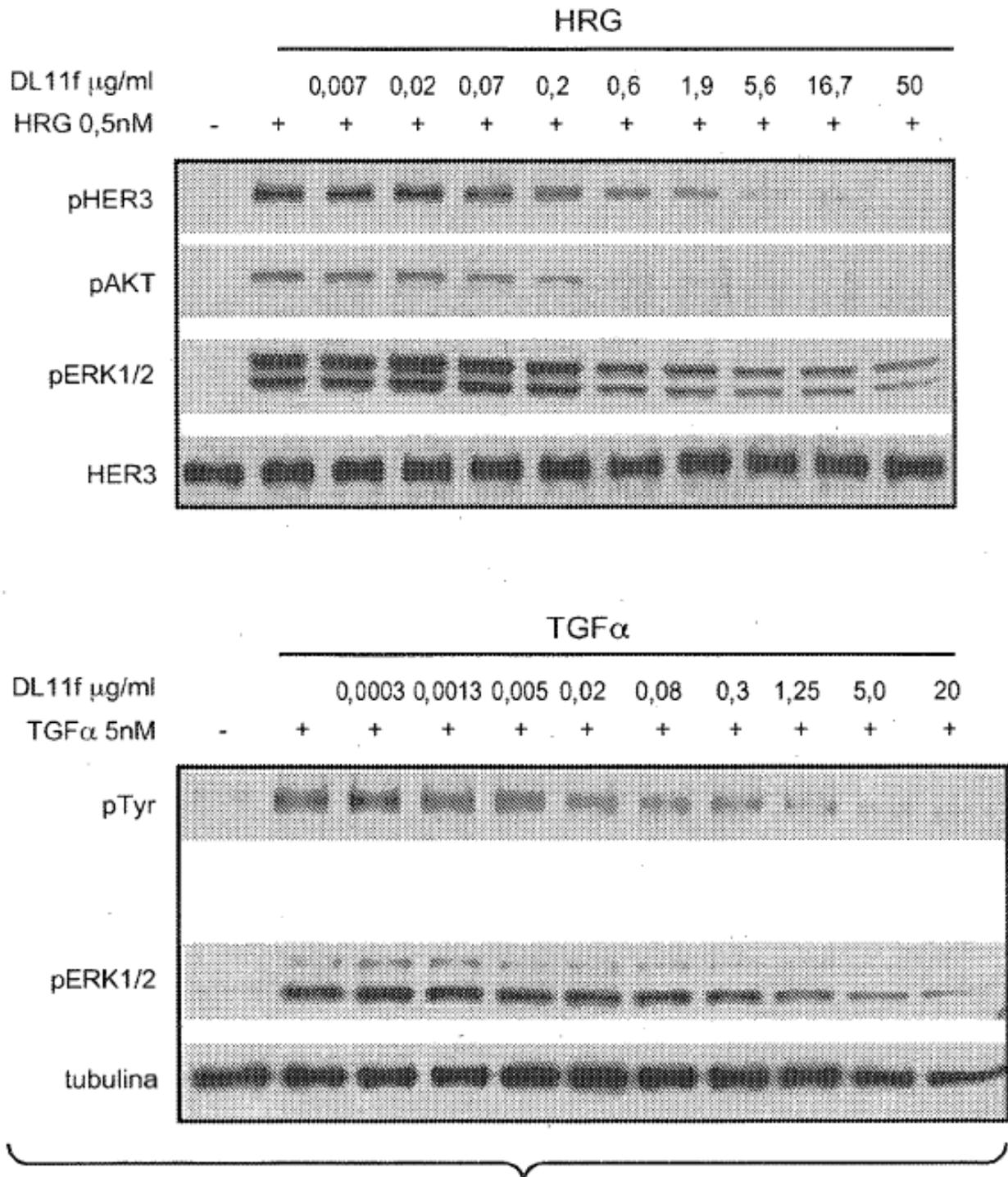


FIG. 16

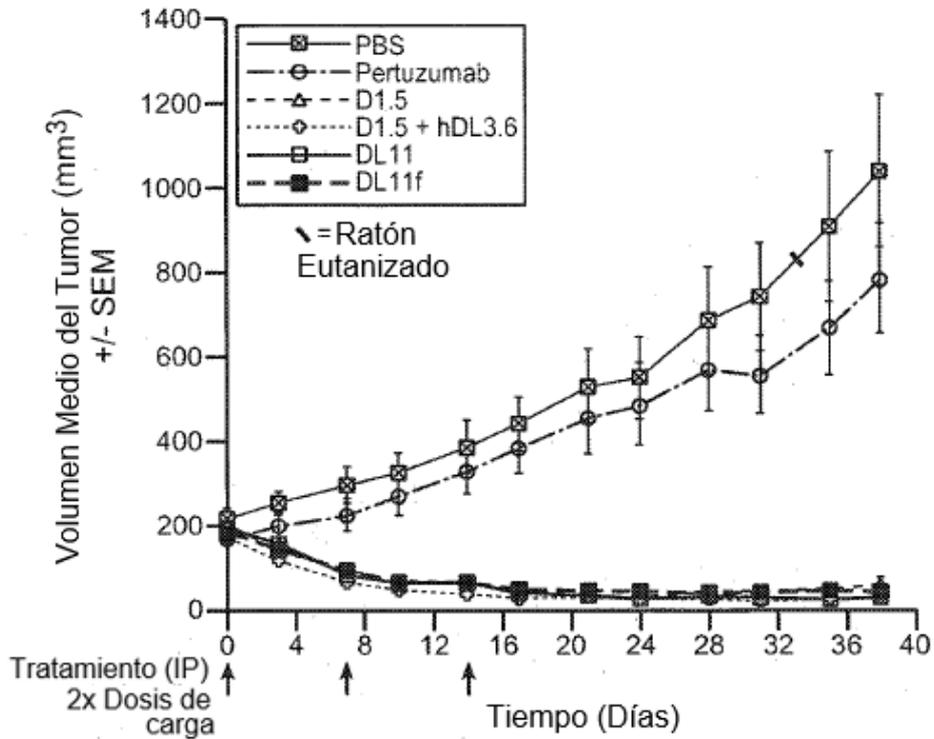


FIG. 17

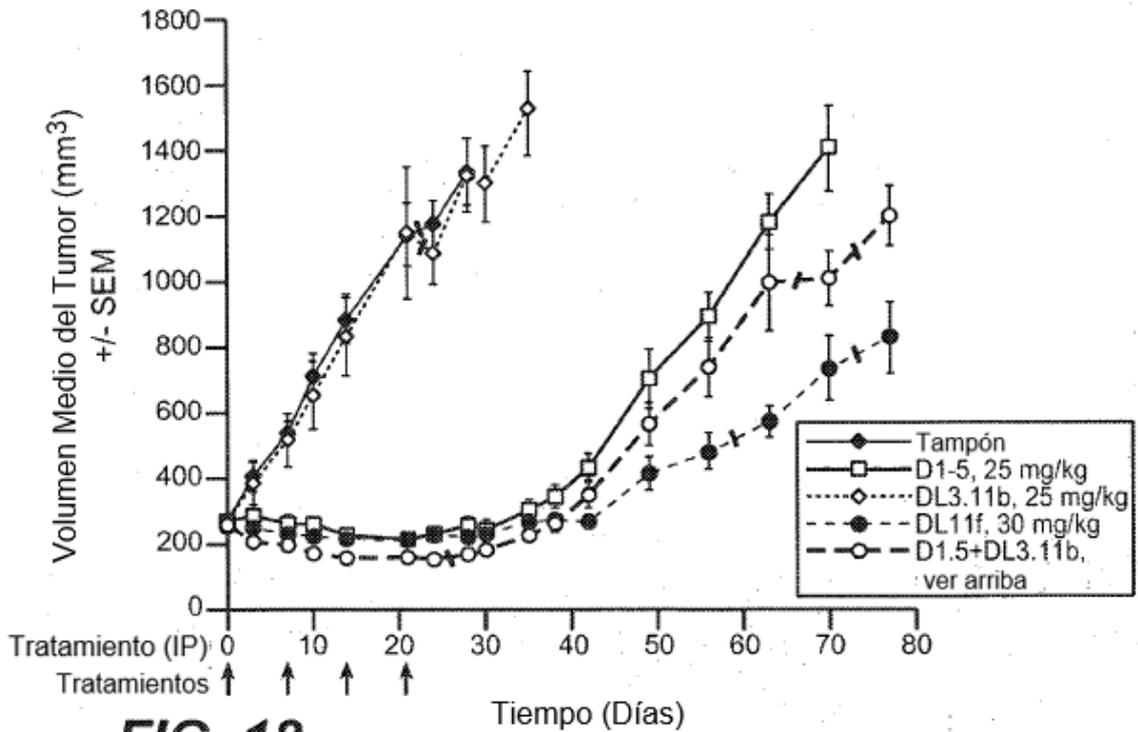


FIG. 18

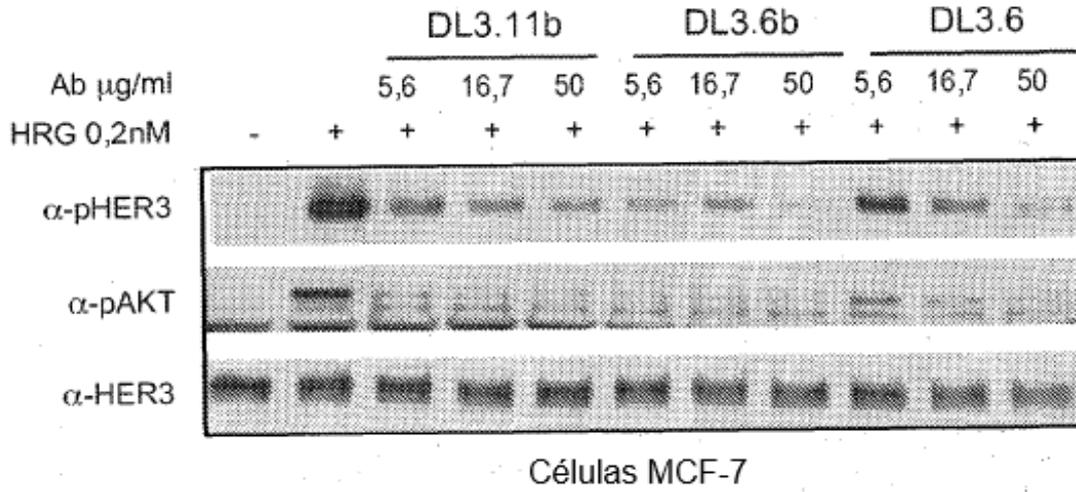


FIG. 19

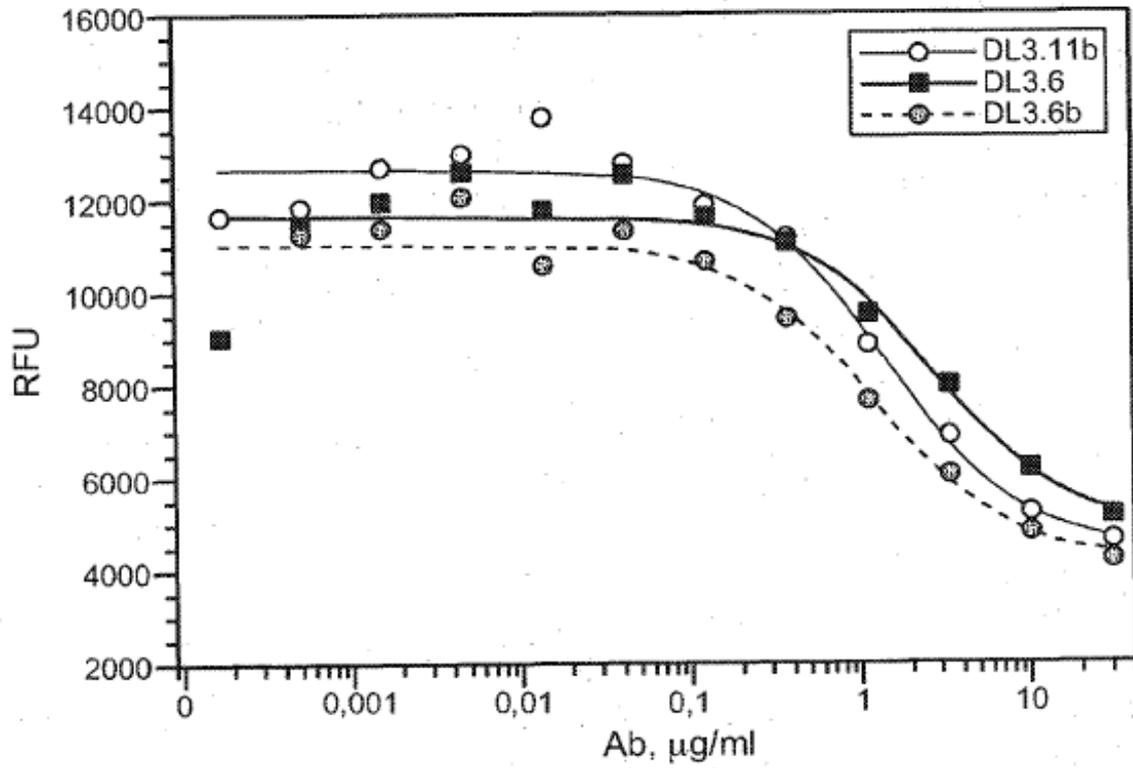
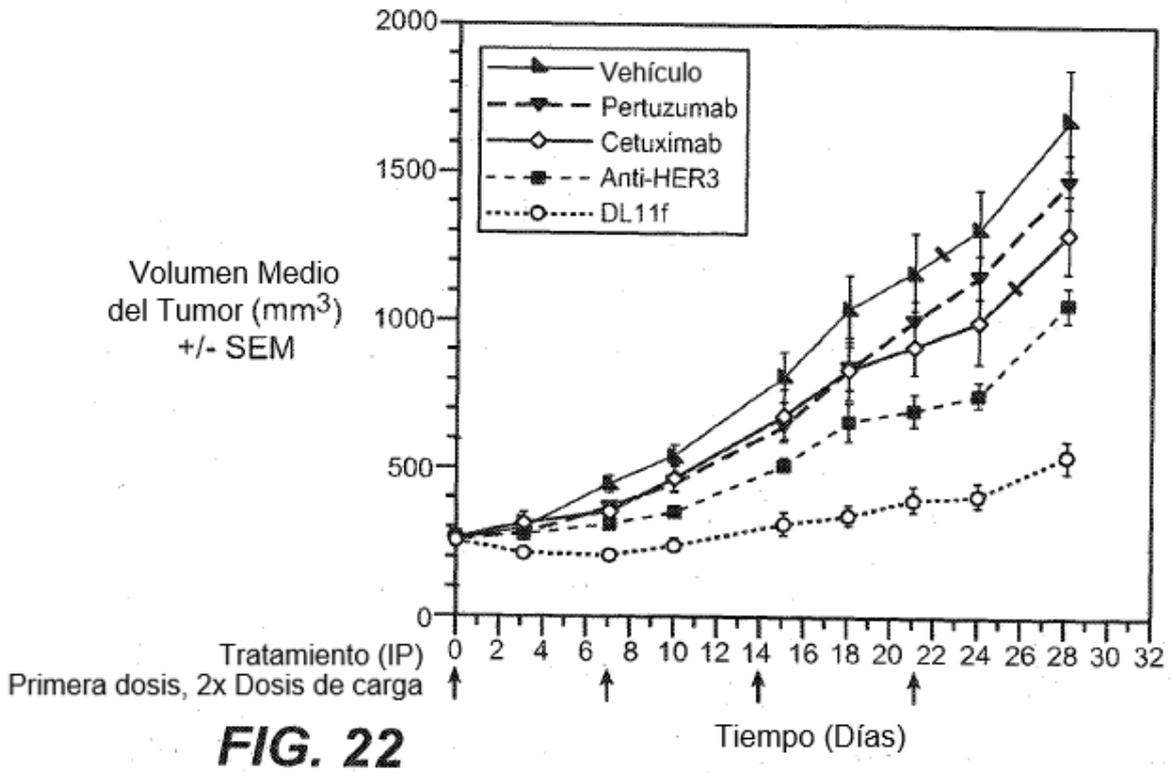
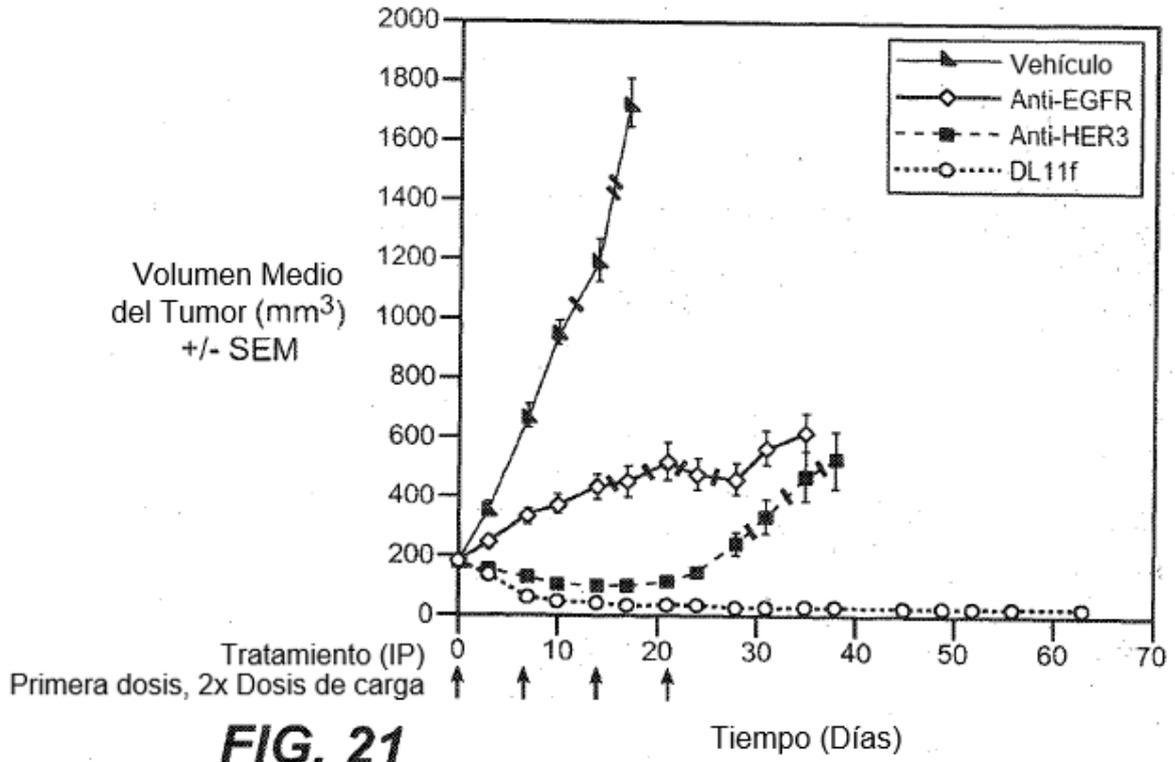


FIG. 20



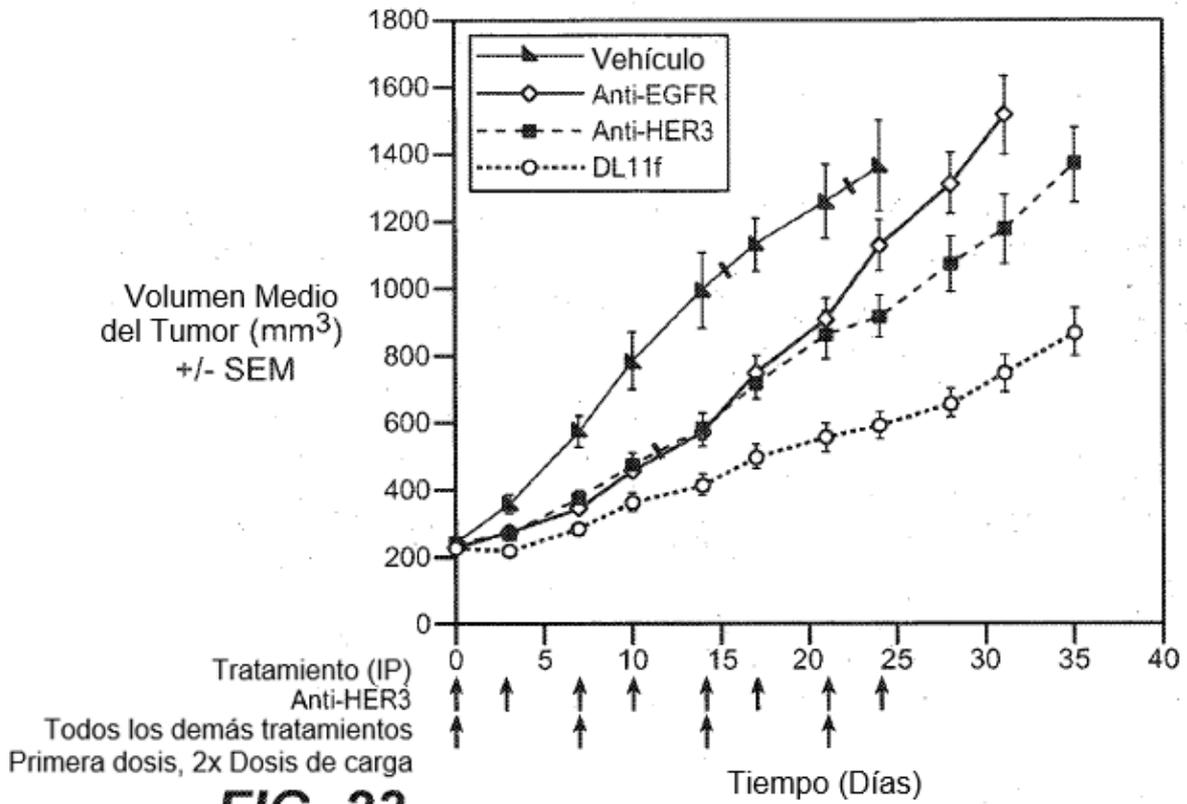


FIG. 23

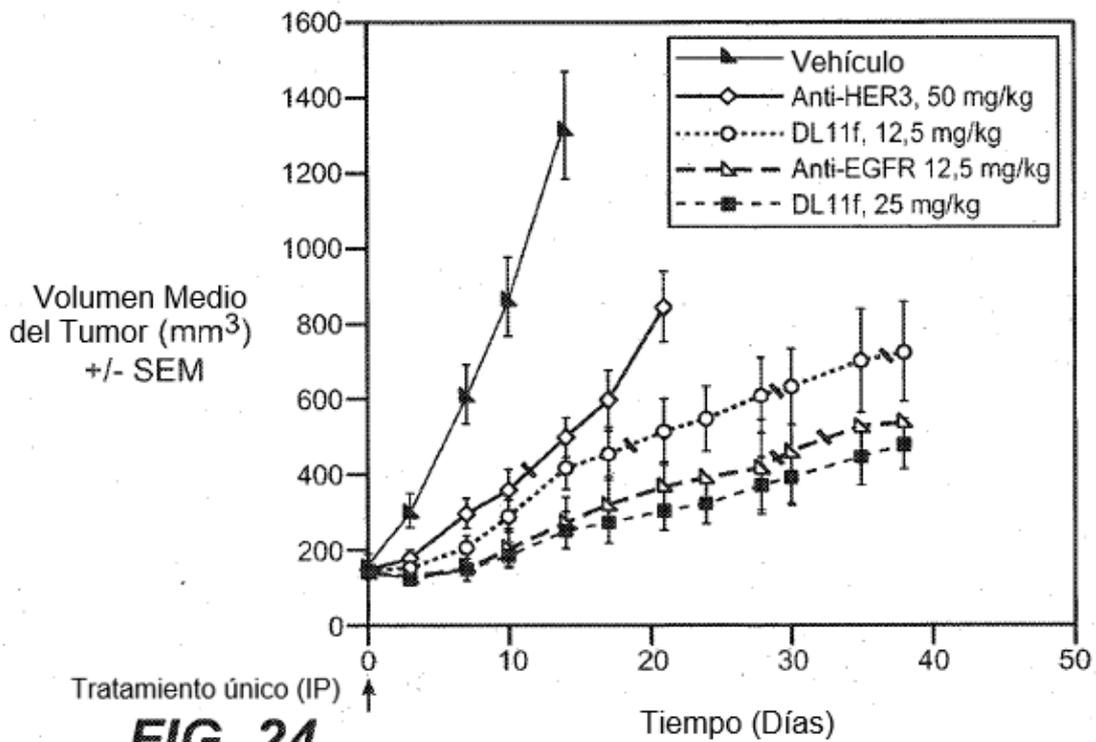


FIG. 24

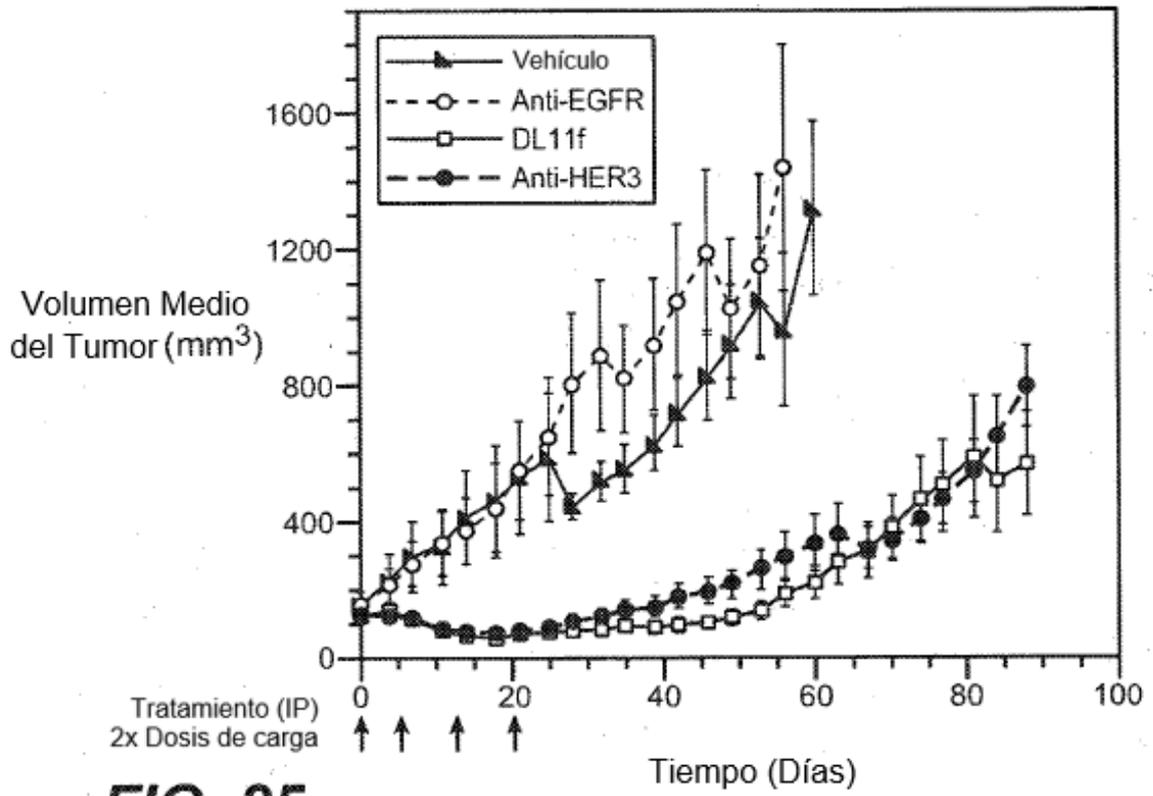


FIG. 25

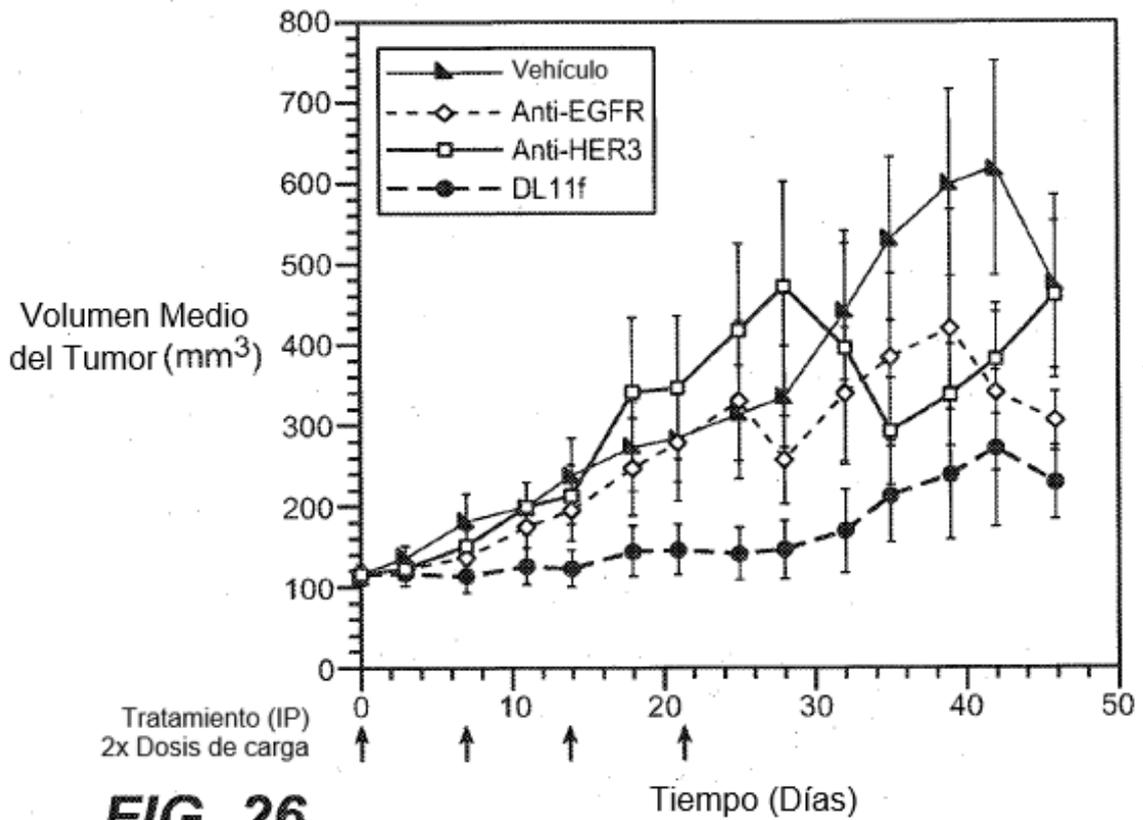


FIG. 26

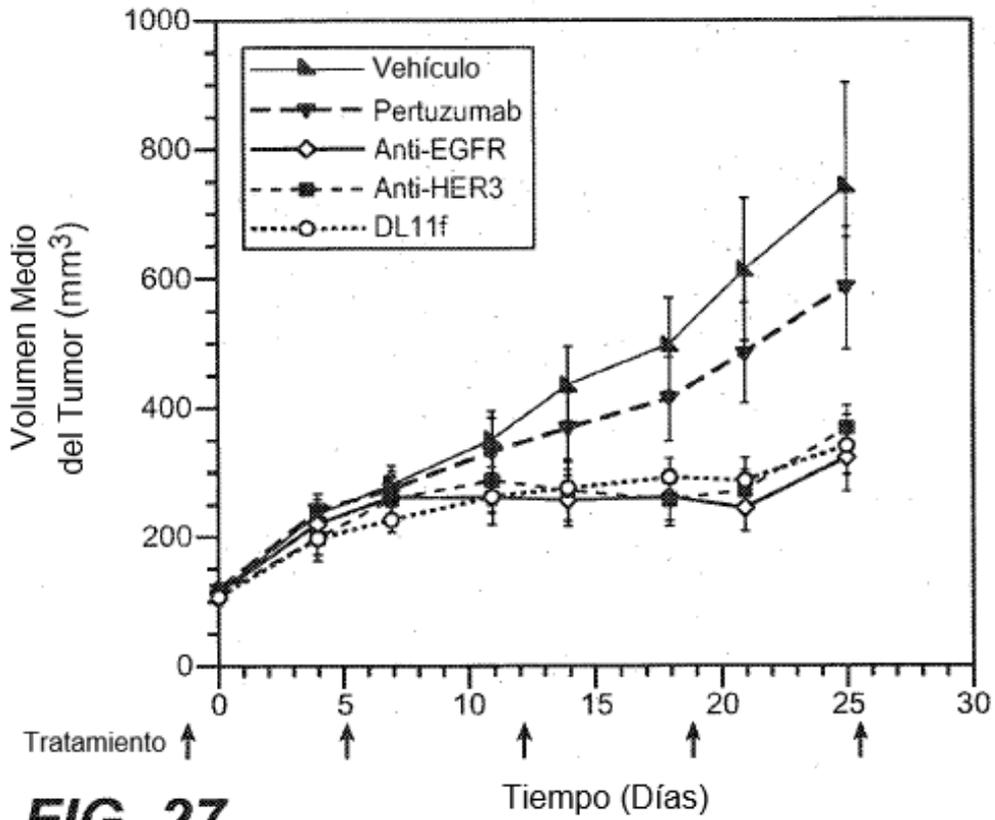


FIG. 27

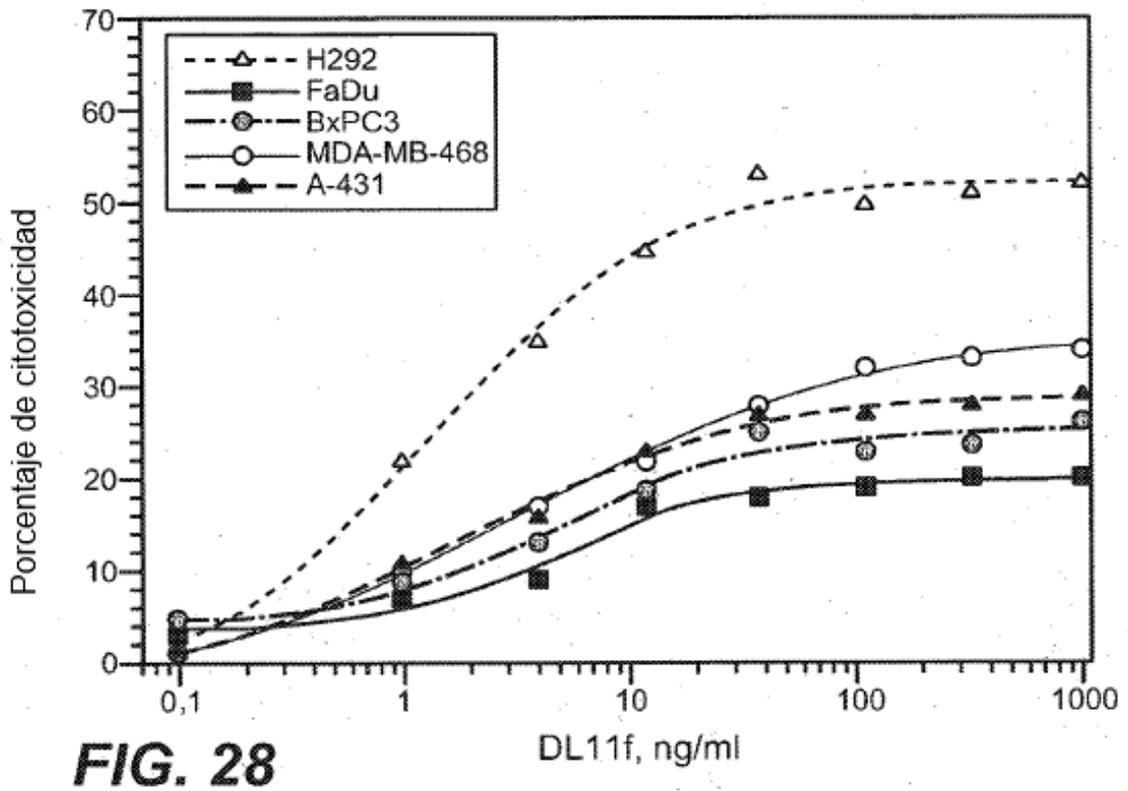


FIG. 28

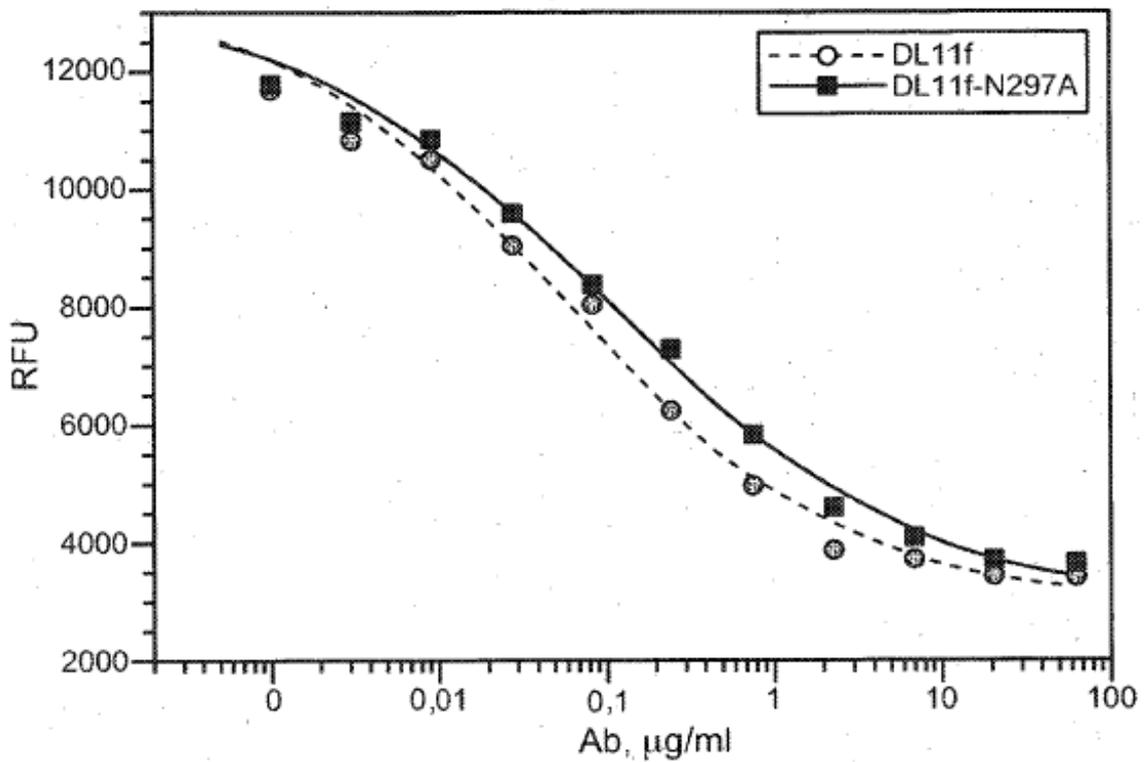
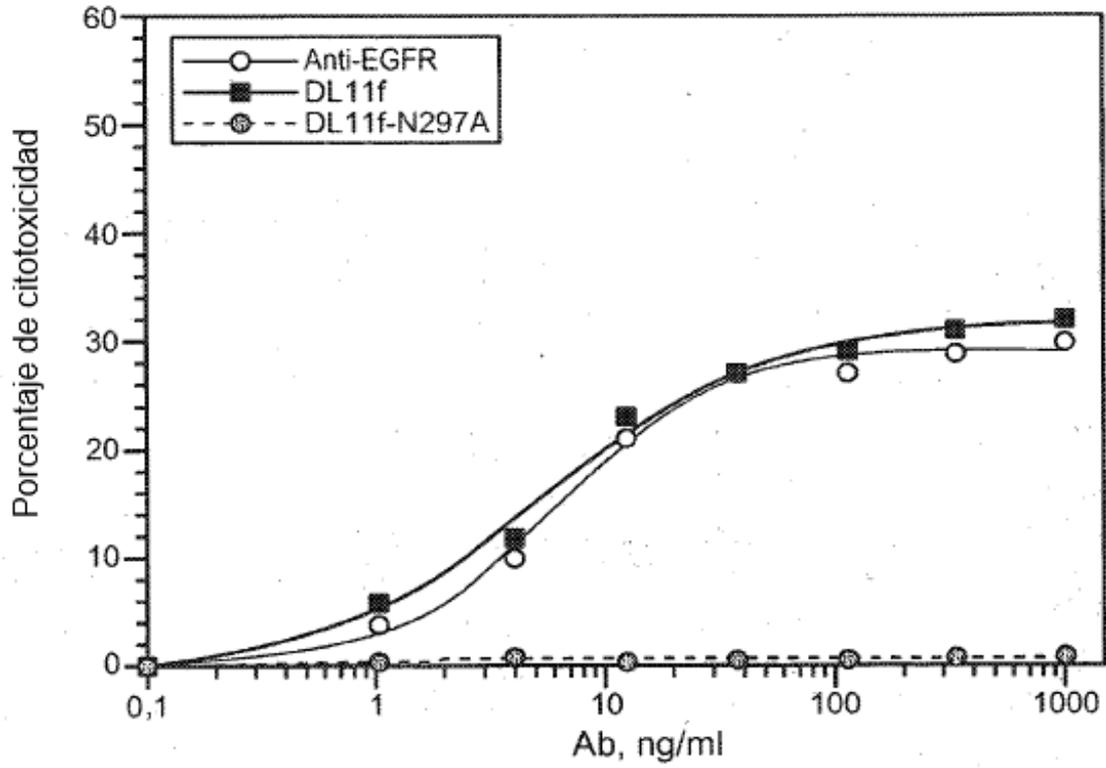


FIG. 29

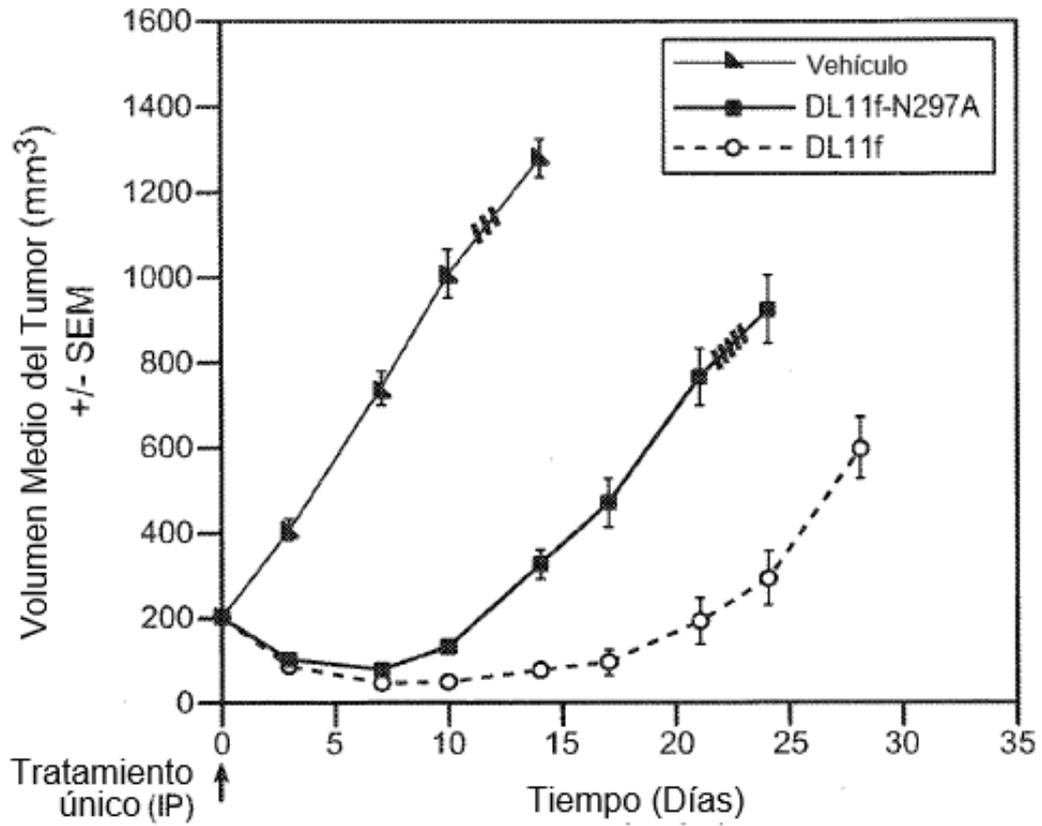


FIG. 30

Antagonista del EGFR	Datos no clínicos	Datos clínicos
<p>ERBITUX® (cetuximab)</p> <p>Imclona (BLA n.º: 125084)</p> <p>Anticuerpo monoclonal quimérico de humano/ratón recombinante que se une específicamente al dominio extracelular del EGFR</p>	<p>Estudio de toxicidad de dosis repetidas de 9 meses llevado a cabo en macacos cangrejeros.</p> <p><u>Dosis y régimen:</u> Administrado una vez semanalmente durante 9 meses a dosis de aprox. 0,4-4 X's (7,5, 24 y 75 mg/kg/semana) por encima de la exposición humana semanalmente basado en BSA</p> <p>Tox. relacionada con el artículo de ensayo principal: Lesiones de la piel de suaves a graves (formación de incrustaciones, eritema, dermatitis, fisuras, heridas, exantema en diversas partes del cuerpo) a todos los niveles de dosis.</p> <p>La gravedad y la aparición eran dependientes de la dosis. La aparición para las dosis altas, medias y bajas fueron los Días de Estudio 15, 22 y 64, respectivamente.</p> <p>La complicación secundaria de las lesiones graves de la piel fue la infección bacteriana o sepsis con posterior muerte del 50 % de los animales en condición moribunda en el grupo de dosis alta.</p>	<p>El régimen de dosificación para cetuximab fue el mismo para todas las pruebas: El Día 1, se dio una dosis de 400 mg/m² y después una dosis de 250 mg/m² durante la duración de la terapia de radiación (6-7 semanas) o hasta el avance de la enfermedad o toxicidades inaceptables.</p> <p>También se informaron toxicidades dermatológicas (erupción acneiforme, secado de la piel y fisuras y secuelas inflamatorias e infecciosas (por ejemplo blefaritis, queratitis, celulitis, quistes)) en las pruebas clínicas. Las complicaciones secundarias se informaron incluyendo sepsis por <i>S. aureus</i> y abscesos que requerían incisión y drenaje.</p> <p>Resultados de las pruebas de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello: se informó de erupción acneiforme en el 76 % de los pacientes tratados con cetuximab solo de los cuales el 1 % se consideraron como graves frente a un 10 % con terapia de radiación sola.</p> <p>Resultados de las pruebas de cáncer colorrectal: se informó de erupción acneiforme en el 89 % de los pacientes tratados con cetuximab de los cuales el 11 % se consideraron como graves.</p>

FIG. 31A

Antagonista del EGFR	Datos no clínicos	Datos clínicos
<p>TARCEVA® (clorhidrato de erlotinib)</p> <p>OSI Pharms/Genentech (NDA N.º 021743)</p> <p>Pequeña molécula que inhibe la fosforilación intracelular de la tirosina quinasa asociada al EGFR</p>	<p>Se llevaron a cabo estudio de toxicidad oral de 6 meses en ratas Sprague-Dawley y estudio de toxicidad oral de 12 meses en perros Beagle.</p> <p>En el resumen del NDA, los sitios diana de toxicidad se listaron y se incluyó la dermatológica en la lista.</p> <p><u>Descubrimientos del estudio en ratas:</u> Dosis – 1, 5 y 10 mg/kg/día</p> <p><u>Descubrimientos clínicos:</u> Lesión de piel descrita como costras en el hocico desde el día 50 en adelante en el grupo de dosis más alta.</p> <p><u>Descubrimientos histopatológicos:</u> degeneración e inflamación de la piel en 2/15 machos y 2/15 hembras a 5 mg/kg/día y 11/15 machos y 11/15 hembras a 10 mg/kg/día. No descubrimiento histopat. en la piel para los controles.</p> <p><u>Descubrimientos del estudio en perros:</u> Dosis – 2,5, 7,5 y 15 mg/kg/día</p> <p><u>Signos clínicos:</u> Todos los grupos de dosis incluían enrojecimiento de la piel (en 2/8, 3/8 y 5/8 perros, respectivamente) y enrojecimiento de la membrana mucosa bucal (en 4/8, 6/8 y 8/8 perros, respectivamente). El tiempo para la aparición de los descubrimientos disminuía con la dosis en aumento.</p>	<p>El régimen de dosificación fue 150 mg al día, 2 horas antes de la ingestión de comida</p> <p><u>Descubrimientos las pruebas clínicas:</u> Generalmente bien tolerado. Las toxicidades que ocurren más frecuentemente incluyen erupción de la piel y diarrea. Las dos últimas toxicidades a veces dieron como resultado la reducción de la dosis o hacer discontinuo el tratamiento.</p>

FIG. 31B

Antagonista del EGFR	Datos no clínicos	Datos clínicos
<p>VECTIBIX® (panitumumab) Amgen (BLA N.º 125147) Anticuerpo monoclonal humanizado completamente recombinante dirigido contra el EGFR humano</p>	<p>Se llevaron a cabo varios estudios repetidos de toxicidad de dosis en el macaco cangrejero. Se informaron varias toxicidades dermatológicas en estos estudios a dosis de 7,5, 15, 30 o 60 mg/kg para tratamiento de duración de 4, 13 o 26 semanas Resultados del estudio de 26 semanas: Dosis: 7,5, 15 y 30 mg/kg/día, bolo IV una vez a la semana. Resumen de los descubrimientos: Toxicidades dermatológicas de suaves a graves (eritema, irritación, crus (normalmente asociado a infecciones secundarias), piel en escamas (tipo caspa), pérdida de pelo, abrasiones y/o lagrimeo ocular o enrojecimiento ocular), muda de la piel, septicemia y muertes (2, 6 y 6 en DS, DM y DA respectivamente) en todos los grupos de dosis. Además, se informaron esporádicamente pápulas y/o ulceración/necrosis en todos los grupos de dosis. Descubrimientos histopatológicos: Hiperqueratosis suave a marcada, acompañada de acantosis epidérmica, paraqueratosis en la piel de animales de todos los grupos de dosis. La gravedad era la misma para los grupos de dosis 15 y 30 mg/kg y ligeramente reducida en el grupo de dosis 7,5 mg/kg. No se determinó NOAEL. Las dosis eran 1,25 a 10 veces mayores que la dosis humana de 6 mg/kg propuesta cada 2 semanas y aproximadamente 3-24 veces mayores que la dosis propuesta de 2,5 mg/kg/semana cuando se ajusta al peso corporal del humano.</p>	<p>El régimen de dosificación fue 6 mg/kg al día cada 2 semanas hasta el avance de la enfermedad <u>Descubrimientos las pruebas clínicas:</u> Uno de los eventos adversos más graves informados fueron toxicidades dermatológicas complicadas por secuelas infecciosas y muerte séptica. Se informaron lesiones de la piel (erupción acneliforme, puritos, piel seca, exfoliación, fisuras de la piel y paroniquia) en el 90 % de 789 pacientes de cáncer colorectal metastásico. Estos estaban en gravedad de Grado 2 con un 12 % de pacientes que tenían Grado 3 en gravedad. También se informó en pacientes (no observado no clínicamente) de Grado 1 o 2 estomatitis y mucositis oral en el 7 % de los pacientes. El desarrollo de toxicidades dermatológicas graves dio lugar a infecciones secundarias (sepsis) y en raras ocasiones incluso la muerte pero más frecuentemente fue necesaria una reducción de la dosis o la interrupción. La revisión del etiquetado incluía una sección de Atención Recuadrada para las toxicidades dermatológicas.</p>

FIG. 31C

Evento Adverso	Nombre corto	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
Erupción/ Descamación	Erupción	Erupción macular o papular o eritema sin síntomas asociados	Erupción macular o papular o eritema con purito u otros síntomas asociados; u otras lesiones que cubren <50 % del área de la superficie corporal (BSA)	Grave, eritroderma generalizado o erupción macular, papular o vesicular, descamación que cubre >50 % de BSA	Dermatitis generalizada, exfoliativa, ulcerativa o ampollosa	Muerte
Erupción: Acné/acneiforme	Acné	Intervención no indicada	Intervención Indicada	Asociado al dolor; desfiguración, ulceración o descamación	-	Muerte

FIG. 32

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

D1 DIQMTQSPSSLSASVGDREVTTITCRASQ DVSTAVAWYQ

D1.5 DIQMTQSPSSLSASVGDREVTTITCRASQ DVSTAVAWYQ

D1.5-100 DIQMTQSPSSLSASVGDREVTTITCRASQ DLATDVAWYQ

DL11 DIQMTQSPSSLSASVGDREVTTITCRASQ DLATDVAWYQ

DL11b DIQMTQSPSSLSASVGDREVTTITCRASQ NIATDVAWYQ

DL11f DIQMTQSPSSLSASVGDREVTTITCRASQ NIATDVAWYQ

Kabat# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 A 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

D1 QKPGKAPKLLI YSASFLLYSSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLLQP

D1.5 QKPGKAPKLLI YSASFLLYSSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLLQP

D1.5-100 QKPGKAPKLLI YSASFLLYSSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLLQP

DL11 QKPGKAPKLLI YSASFLLYSSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLLQP

DL11b QKPGKAPKLLI YSASFLLYSSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLLQP

DL11f QKPGKAPKLLI YSASFLLYSSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLLQP

Kabat# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

D1 EDFATYYCYCQQSYYTTP PTFGQCGTKV EIKR

D1.5 EDFATYYCYCQQSYP TP YTFGQCGTKV EIKR

D1.5-100 EDFATYYCYCQQS EPEP YTFGQCGTKV EIKR

DL11 EDFATYYCYCQQS EPEP YTFGQCGTKV EIKR

DL11b EDFATYYCYCQQS EPEP YTFGQCGTKV EIKR

DL11f EDFATYYCYCQQS EPEP YTFGQCGTKV EIKR

FIG. 33A

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 A B 36 37 38 39 40 41

D1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLLSCAASGFTFTGNNWIHWV R Q A P
 D1.5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLLSCAASGFTFTGNNWIHWV R Q A P
 D1.5-100 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLLSCAASGFTFTGNNWIHWV R Q A P
 DL11 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLLSCAASGFTFTLSSGDDWIIHWV R Q A P
 DL11b EVQLVESGGGLVQPGGSLRLLSCAASGFTFTLSSGDDWIIHWV R Q A P
 DL11f EVQLVESGGGLVQPGGSLRLLSCAASGFTFTLSSGDDWIIHWV R Q A P

Kabat# 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a b c 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

D1 GKGLIEWVGEISSP SGGYTDYADSVKKGRRFTISSADTSSKNTAYL
 D1.5 GKGLIEWVGEISSP SGGYTDYADSVKKGRRFTISSADTSSKNTAYL
 D1.5-100 GKGLIEWVGEISSP SGGYTDYADSVKKGRRFTISSADTSSKNTAYL
 DL11 GKGLIEWLGEISSA ACGYTDYADSVKKGRRFTISSADTSSKNTAYL
 DL11b GKGLIEWLGEISSA ACGYTDYADSVKKGRRFTISSADTSSKNTAYL
 DL11f GKGLIEWVGEISSA ACGYTDYADSVKKGRRFTISSADTSSKNTAYL

Kabat# 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 a b c D E F G H I J K 101 102 103 104 105 106 107 108 109

D1 QMNSLR A E D T A V Y Y C A R E S R V S Y E A A M D Y W G Q G T L V
 D1.5 QMNSLR A E D T A V Y Y C A R E S R V S Y E A A M D Y W G Q G T L V
 D1.5-100 QMNSLR A E D T A V Y Y C A R E S R V S Y E A A M D Y W G Q G T L V
 DL11 QMNSLR A E D T A V Y Y C A R E S R V S Y E A A M D Y W G Q G T L V
 DL11b QMNSLR A E D T A V Y Y C A R E S R V S Y E A A M D Y W G Q G T L V
 DL11f QMNSLR A E D T A V Y Y C A R E S R V S Y E A A M D Y W G Q G T L V

FIG. 33B