

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 961**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2011 PCT/IB2011/054834**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO2012059857**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2011 E 11797354 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2635604**

54 Título: **Composición de anticuerpos pan-HER**

30 Prioridad:

06.09.2011 US 201161531407 P

05.09.2011 DK 201100672

01.11.2010 US 408782 P

01.11.2010 DK 201000988

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

14.06.2017

73 Titular/es:

SYMPHOGEN A/S (100.0%)

Pederstrupvej 93

2750 Ballerup, DK

72 Inventor/es:

PEDERSEN, MIKKEL, WANDAHL;

CHRISTENSEN, IDA, K.;

LANTTO, JOHAN;

JACOBSEN, HELLE y

KRAGH, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 616 961 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de anticuerpos pan-HER

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos recombinantes que se dirigen a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y a composiciones que comprenden dos o más de estos anticuerpos para su uso en carcinoterapia humana.

10

Antecedentes de la invención

La familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (familia EGFR o ErbB/HER) es un subgrupo de receptores tirosina quinasa (RTK) y consisten en cuatro miembros: EGFR/ErbB, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 y HER4/ErbB4. Los miembros de la familia EGFR son glucoproteínas modulares de cadena simple, estrechamente relacionadas con una región extracelular de unión al ligando, un dominio transmembrana simple y una tirosina quinasa intracelular. En contextos fisiológicos normales, la familia ErbB regula los eventos clave en la coordinación del crecimiento, diferenciación y migración celular. Se cree que EGFR, HER2 y HER3 juegan papeles cruciales en la transformación maligna de las células normales y en el crecimiento continuo de las células cancerosas. Se ha encontrado que EGFR y HER2 son sobreexpresados por muchos cánceres epiteliales. La sobreexpresión de EGFR y HER2 ha estado además vinculada a la progresión de la enfermedad, supervivencia reducida, mala respuesta y resistencia a la quimioterapia en varios cánceres epiteliales humanos. El papel de HER4 en la transformación maligna y la progresión del cáncer ha sido objeto de controversia y no será discutido posteriormente aquí.

15

20

25

EGFR y HER2 son dianas validadas del cáncer, habiéndose aprobado para el tratamiento de diversos cánceres anticuerpos monoclonales e inhibidores de molécula pequeña de su tirosina quinasa. HER3 está siendo actualmente explorado como un objetivo terapéutico potencial. Sin embargo, los pacientes que responden inicialmente a estas terapias a menudo recaen debido a la aparición de resistencia adquirida. Los estudios preclínicos apuntan a la implicación de uno o ambos de los receptores no objetivo en el desarrollo de la resistencia. De este modo, parece que los receptores ErbB tienen la capacidad para reemplazarse uno al otro con el fin de mantener la señalización estimuladora del crecimiento y un fenotipo maligno. La elección como dianas simultáneas de dos o los tres receptores podría por lo tanto ser una manera más eficiente de inhibir las células cancerosas con dependencia de la familia ErbB.

30

35

EGFR es una glucoproteína de la superficie celular de 170 kDa que consiste en una cadena polipeptídica simple de 1.186 restos de aminoácidos como se determinó originalmente y se describió por clonación y secuenciación de los ADNc humanos a partir de una línea celular de carcinoma vulvar humano. EGFR contiene tres dominios principales: un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que contiene la tirosina quinasa. La actividad catalítica de los restos de EGFR radica en el dominio de tirosina quinasa (resto 685-953) y es activado tras la unión al ligando.

40

45

El EGFR existe en dos conformaciones diferentes, específicamente una conformación trabada (cerrada) y una conformación extendida (abierta). El receptor se cambia entre las dos conformaciones. En la conformación trabada el dominio II y el IV de la región extracelular del EGFR interactúan, dejando al receptor en un estado autoinhibido. Además, el dominio III es mantenido a una distancia significativa del dominio I, con lo cual es imposible la unión de EGF a ambos dominios simultáneamente. En la conformación extendida del EGFR, el dominio I, II y III están estéricamente dispuestos en una forma de C, dejando espacio para la unión a EGF. Además, los cambios conformacionales inducen la exposición de una β -horquilla que consiste en una región de 20 restos en el dominio II, también conocido como el "brazo de dimerización". El brazo de dimerización que se extiende desde el dominio II del EGFR tiene un amplio contacto con el dominio II de otro EGFR, con lo cual se forma un homodímero de EGFR.

50

55

La dimerización lleva los dominios de tirosina quinasa citoplásmicos, activos de los receptores lo suficientemente cerca para la fosforilación de los restos de tirosina en las regiones reguladoras. Además, las regiones yuxtamembrana de los dos receptores forman un dímero antiparalelo que se ha encontrado que es importante en la estabilización del dímero de tirosina quinasa. El mecanismo de dimerización "mediado por el receptor" es exclusivo de la familia ErbB en comparación con otros receptores tirosina quinasa donde la dimerización "mediada por el ligando" es el caso más común.

60

65

Se han sugerido varios modos de activación del dominio de tirosina quinasa intracelular del EGFR. Al contrario que otros receptores tirosina quinasa, el dominio de tirosina quinasa del EGFR adopta por omisión una conformación normalmente observada únicamente en las quinasa fosforiladas y activadas. Esto indica que el dominio quinasa del EGFR es constitutivamente activo. La regulación de una tirosina quinasa constitutiva podría de este modo ocurrir a partir de la administración de una región reguladora C-terminal de la pareja de dimerización para la transfosforilación. Otra posibilidad es que la activación del dominio de tirosina quinasa involucre el desplazamiento de las interacciones inhibitorias que no han sido visualizadas en estudios cristalográficos. Sin embargo, los análisis de la estructura cristalina de la yuxtamembrana y de la tirosina quinasa del EGFR han revelado que un dímero asimétrico

de las tirosinas quinasas formadas después de la dimerización de los dos EGFR, es importante para la regulación de la actividad de tirosina quinasa. En este homodímero asimétrico, una de las tirosinas quinasas juega el papel de receptor, mientras que la otra tirosina quinasa juega el papel de donante. Únicamente el dominio de quinasa del receptor tiene actividad catalítica y procede a fosforilar los restos de tirosina en la cola C-terminal del receptor (se desconoce si es en posición *cis* como *trans*, o ambas).

La endocitosis mediada por clatrina es el mecanismo más importante de la regulación a la baja del EGFR. El destino del EGFR depende de la estabilidad del complejo ligando-receptor. Después de la unión del EGF al EGFR, el homodímero de EGFR es rápidamente dirigido a las depresiones recubiertas de clatrina e internalizado a través de endocitosis inducida por ligando. Simultáneamente, el EGFR es fuertemente ubiquitinado por el acoplamiento de la monoubiquitina y poliubiquitina. La ubiquitina ligasa Cbl es responsable de la ubiquitinación del EGFR. Cbl se une directamente o indirectamente a través de una proteína adaptadora tal como Grb2 a los restos de tirosina fosforilados en la región reguladora de EGFR. La unión de Cbl a EGFR vía Grb2 es necesaria para la internalización del receptor. Esp15 juega también un papel en la internalización de EGFR. El papel exacto de Esp15 es no obstante todavía objeto de controversia. La ubiquitinación está involucrada en la regulación a la baja de la endocitosis de EGFR y la clasificación endosómica de EGFR a los lisosomas. Las cadenas de ubiquitina son reconocidas por el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT) y el Hrs/STAM, el cual retiene las proteínas ubiquinadas en la membrana de los endosomas tempranos, con lo cual se impide el reciclado del EGFR. Posteriormente, el EGFR es clasificado en vesículas intraluminales (ILV) lo cual conduce a la distribución del EGFR al endosoma tardío y finalmente a la degradación de los lisosomas.

Al contrario de lo que sucede con la degradación del EGFR cuando se une al EGF, la unión del TGF- α permite el reciclado del receptor. El ligando de TGF- α se disocia rápidamente del EGFR en el endosoma temprano debido al ambiente ácido, conduciendo a la desfosforilación del receptor, a la des-ubiquitinación y con esto al reciclado del receptor nuevamente hacia la superficie celular. La unión de EPR a EGFR tiene el mismo efecto sobre la clasificación endocítica de EGFR como TGF- α . HB-EGF y BTC se dirigen a todos los EGFR para la degradación lisosomal mientras que AR provoca el reciclado tanto rápido como lento del EGFR.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2, ErbB2 o Neu) fue primeramente descrito en 1984 por Schechter *et al.* HER2 consiste en 1.234 aminoácidos y es estructuralmente similar al EGFR con un dominio extracelular que consiste en cuatro subdominios I-IV, un dominio transmembrana, un dominio yuxtamembrana, una tirosina quinasa citoplásmica intracelular y un dominio C-terminal regulador.

El contacto del dominio II-IV que restringe la disposición del dominio en el EGFR trabado está ausente en HER2. Tres de los siete restos conservados importantes para la estabilización de la traba en el EGFR no activado, son diferentes en HER2. HER2 de este modo se asemeja a EGFR en su forma extendida (abierta) con el brazo de dimerización expuesto y aparentemente equilibrado para impulsar las interacciones receptor-receptor. La ausencia de una conformación de HER2 trabada indica que el receptor carece de la autoinhibición como se observa para los otros miembros de la familia ErbB. Una interfaz estable del subdominio I-III parece mantener HER2 en la configuración extendida similar a la configuración extendida del complejo EGFR-EGF. La interacción entre los dominios I y III involucra las regiones que corresponden a los sitios de unión al ligando en los dominios I y III del EGFR, no dejando espacio estéricamente para los ligandos, haciendo que HER2 sea incapaz de unirse a los ligandos. Los dominios II y IV forman dos interconexiones distintas que estabilizan la formación del heterodímero de HER2 y otro miembro más de la familia ErbB.

Los estudios biofísicos no han logrado detectar la homodimerización significativa de HER2 en solución o en cristales. Los restos del dominio II de EGFR y HER2 son similares. Sin embargo, Arg285 en la interconexión del dímero no está conservada entre EGFR y HER2. El resto 285 de HER2 es Leu. Los estudios de mutación indican que Leu en esta posición es parcialmente responsable de la ausencia de los homodímeros de HER2 en solución. La dimerización de HER2 intacto *in vivo* puede, requerir interacciones adicionales de los sitios del dominio transmembrana de HER2.

HER2 es el único miembro de la familia ErbB que no se une a los ligandos conocidos. HER2 es más bien activado a través de la formación de los complejos heteroméricos con otros miembros de la familia ErbB y con esto es regulado indirectamente por los ligandos de EGFR y HER3. HER2 es la pareja de heterodimerización preferida de los otros tres receptores de ErbB. HER2 aumenta la afinidad de los otros receptores de ErbB por sus ligandos al retardar la velocidad de disociación del complejo ligando-receptor, con lo cual HER2 aumenta y prolonga la señalización. La capacidad de HER2 para aumentar la afinidad al ligando de otro receptor de ErbB puede reflejar el comportamiento promiscuo de HER2 como una pareja de heterodimerización. La heterodimerización de HER2 y otros receptores unidos al ligando de la familia ErbB induce la fosforilación cruzada, conduciendo a la fosforilación de los restos de tirosina C-terminales. El heterodímero de HER2 más activo es el complejo HER2-HER3. HER2 complementa el HER3 deficiente en quinasa, por provisión de una quinasa activa.

Al contrario que EGFR, HER2 es resistente a la internalización cuando se sobreexpresa. La sobreexpresión de HER2 ha sido además descrita como inhibidora de la endocitosis de los otros miembros de la familia ErbB. Se han sugerido dos mecanismos mediante los cuales HER2 escapa a la degradación lisosomal y con esto permanece en la

membrana plasmática. HER2 evita la internalización o bien es eficientemente reciclado a partir de los endosomas nuevamente hacia la membrana plasmática. Los estudios que utilizan anticuerpos marcados han mostrados que HER2 es constantemente internalizado y reciclado. Otros estudios, por el contrario, no consiguieron identificar HER2 intracelular en las células tratadas con los compuestos que se sabe inhiben el reciclado.

5 Se ha propuesto que el terminal carboxilo de HER2 no posee todas las señales requeridas para la internalización o que contiene una señal inhibitoria esencial para la endocitosis mediada por clatrina. Además, los estudios han mostrado que los heterodímeros de HER2 no son distribuidos a los endosomas. Un sitio de acoplamiento a Cbl como aquel encontrado en EGFR ha sido también identificado en HER2 (Y1112). De este modo, Cbl puede ser reclutado a HER2, conduciendo a la ubiquitinación de HER2, pero la eficiencia de enlace efectiva de Cbl no es clara. Se ha propuesto que HER2 es resistente a la internalización debido a su asociación con las protuberancias de la membrana. Finalmente, otros estudios han mostrado que la resistencia a la endocitosis de los heterodímeros de HER2-EGFR está asociada con la formación ineficiente inducida por EGF de las depresiones recubiertas con clatrina.

15 El tercer miembro de la familia ErbB, conocido como el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 3 (HER3, ErbB3) fue identificado en 1989 por Kraus M. H. et al. El gen HER3 codifica una proteína de 1.342 aminoácidos con similitudes estructurales sorprendentes a EGFR y HER2. Las características tales como el tamaño completo, cuatro subdominios extracelulares (I-IV) con dos grupos de cisteína (dominios II y IV) y un dominio de tirosina quinasa muestran similitudes estructurales con EGFR y HER2. El dominio de tirosina quinasa de HER3 muestra un 59 % de homología secuencial con el dominio de tirosina quinasa de EGFR.

25 Al igual que EGFR, HER3 existe en una conformación trabada y en una conformación extendida. En la conformación trabada, el brazo de dimerización está enterrado por interacciones con el dominio IV, dejando los dominios I y II demasiado separados para una unión eficiente al ligando. La unión del ligando a los dominios extracelulares I y III ocurre en la conformación extendida de HER3 y conduce a la heterodimerización con otros miembros de la familia ErbB. No se forman homodímeros de HER3 después de la unión del ligando. La molécula HER3 extendida y unida al ligando Preferiblemente se heterodimeriza con HER2.

30 Al contrario que EGFR y HER2, la tirosina quinasa de HER3 tiene actividad catalítica alterada, insuficiente para cualquier respuesta biológica detectable. Dos restos de aminoácidos que están altamente conservados en los dominios catalíticos de las proteínas quinasas están alterados en el dominio catalítico de HER3. Estos son la sustitución de asparagina por ácido aspártico en el resto 815 y la sustitución de histamina por glutamato en el resto 740. Las dos sustituciones de aminoácidos pueden ser la razón por la que HER3 carece de actividad catalítica de su dominio de tirosina quinasa. Debido a la actividad de quinasa intrínseca alterada de HER3, el receptor necesita heterodimerizarse con otro miembro de la familia de ErbB con el fin de responder a su propia unión al ligando.

35 Se sabe poco respecto a la endocitosis de HER3. Además, diferentes estudios han sugerido que HER3 no es sometido a endocitosis en el mismo grado que HER2. En concordancia con esto, se encontró que el complejo HER3-NRG1 es internalizado menos eficientemente y más lentamente que el complejo EGFR-EGF, lo que apoya la opinión de que HER3 no es sometido a endocitosis tan eficientemente como EGFR. Sin embargo, cuando la cola C-terminal de EGFR era reemplazada con la cola C-terminal de HER3, EGFR no sufría endocitosis, sugiriendo que una región en el C-terminal de EGFR protege al receptor contra la internalización. Se ha sugerido también que NRG1 no dirige eficientemente HER3 a la degradación, debido a la disociación de los complejos ligando-receptor en los endosomas, como se observado cuando EGF es activado por TGF α .

40 La selección como diana de la familia ErbB ha sido intensamente perseguida en la última década como una estrategia de tratamiento del cáncer. Han sido exploradas diferentes modalidades de tratamiento tales como los inhibidores de la tirosina quinasa (TKI), anticuerpos monoclonales (mAbs) y trampas de ligando. Una ventaja de los anticuerpos monoclonales para el tratamiento del cáncer es la especificidad de la diana, asegurando una baja toxicidad en comparación con la quimioterapia citotóxica convencional contra el cáncer. Los anticuerpos monoclonales han sido aprobados para el tratamiento de los tumores sólidos con niveles anormalmente altos de EGFR o HER2 y numerosos mAbs que se dirigen a EGFR o HER2 están en fase de ensayos clínicos. Los TKI inhiben la señalización del receptor mediante la unión al sitio de unión al ATP en el dominio de tirosina quinasa del EGFR y HER2. Erlotinib/Tarceva® inhibe las tirosinas quinasas de EGFR mientras que lapatinib/Tykerb® inhibe las tirosinas quinasas de EGFR y HER2. Erlotinib y lapatinib son TKI aprobados por la FDA para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) y el cáncer de mama metastásico que sobreexpresa HER2, respectivamente.

45 Sin embargo, a pesar de la utilidad clínica de la terapia con el anticuerpo monoclonal y los TKI, el desarrollo de la resistencia adquirida al tratamiento es un problema cada vez mayor. La terapia combinatoria de los mAbs y la quimioterapia citotóxica convencional es uno de los procedimientos que son llevados a cabo con el fin de incrementar la eficiencia de tratamiento. Además, están siendo exploradas ciertas estrategias para incrementar la eficiencia de los anticuerpos monoclonales, incluyendo el aumento de las funciones efectoras y la ramificación directa e indirecta de los anticuerpos con radionúclidos o toxinas. Otra estrategia más es las combinaciones de los mAbs contra diferentes dianas.

La explicación científica de la inhibición doble de los receptores de ErbB se basa en diversos estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* los cuales han dado como resultado una actividad antitumoral superior, utilizando un procedimiento de ErbB doble en vez de la selección como diana de un receptor simple. La selección como diana simultánea de múltiples epítomos en EGFR y HER2 por mezclas de anticuerpos monoclonales, ha demostrado ser superior a los mAbs *in vitro* e *in vivo* (Friedman et al., PNAS 2005, 102:1915-20) y la combinación entre el TKI gefitinib y los dos mAbs trastuzumab y pertuzumab proporcionaron eficacia antitumoral significativamente mejorada, en comparación con cualquier agente simple en ratones portadores de tumores de xenoinjerto de las células de cáncer de mama que sobreexpresan HER2 (Arpiño et al., J Natl Cancer Inst 2007, 99:694-705).

Se ha observado que la capacidad de coactivación de los receptores tirosina quinasa en la familia de receptores de ErbB ocurre durante la transformación oncogénica *in vitro* y parece jugar un papel esencial en el desarrollo y la progresión de los tumores primarios humanos. El papel cooperativo de los miembros de la familia ErbB ha sido además apoyado por estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran que la resistencia a los mAbs y a los TKI en las células cancerosas que sobreexpresan ErbB, está asociada con una actividad incrementada de otros miembros de la familia ErbB. La coactivación con los RTK permite a las células cancerosas activar simultáneamente dos o más RTK con el fin de alcanzar una robustez de red e incrementar la diversidad del resultado de señalización. La coactivación de RTK ha sido recapitulada en múltiples tipos de cáncer, particularmente en el contexto de la resistencia adquirida a los TKI, lo que sugiere que el cambio oncogénico como resultado de la coactivación de RTK pueda ser un mecanismo general mediante el cual las células cancerosas logran la quimiorresistencia a través de la actividad continua de las moléculas de señalización en dirección 3'. La coactivación de RTK ha sido descrita además en un estudio por Pillay et al, Neoplasia 2009; 11:448-58, 2 demostrando una jerarquía de los receptores tirosina quinasa activados, permitiendo de este modo una compensación rápida de un RTK secundario después de la inactivación del RTK dominante. La coactivación de los RTK secundarios puede ocurrir mediante la secreción del factor de crecimiento autocrino-paracrino, la transfosforilación directa por el RTK dominante, la fosforilación indirecta a través de un intermediario de la señalización tal como Src o la regulación transcripcional. Los ejemplos de RTK dominantes incluyen EGFR y HER2, mientras que los RTK secundarios pueden incluir HER3.

Una posible estrategia potencial para superar la resistencia a los mAb y a los TKI utilizados para el tratamiento del cáncer con altos niveles de receptores de la familia ErbB, puede incluir la selección simultánea como diana de múltiples receptores de ErbB con el fin de interrumpir la señalización de RTK oncogénica y superar el mecanismo compensatorio. Tal estrategia podría inducir perturbaciones no comunes en la robusta red de señalización de ErbB y con esto superar con esperanzas el desarrollo de la resistencia.

Khan I, et al., 2010. Assay and Drug Development Technologies. 8(1):27-36 se refiere a una mezcla de microperlas recubiertas con anticuerpos contra EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 para su uso en la inmunoprecipitación.

Kuwada SK, et al., 2004. International Journal of Cancer. 109(2):291-301 se refiere a la inhibición de HER-2, la inhibición de EGFR y a la combinación de las mismas, para el tratamiento del cáncer. Larbouret C, et al., Clinical Cancer Research. 13(11):3356-3362 se refiere al tratamiento *in vivo* de los xenoinjertos BxPC-3 o MiaPaCa-2-xenografts usando un anticuerpo anti-EGFR (matuzumab) y un anticuerpo anti-HER2 (trastuzumab) solo o en combinación. Coyne CP, et al., 2009. Journal of Drug Targeting. 17(6):474-489 se refiere al tratamiento del carcinoma mamario SKBr-3 resistente a quimioterapéuticos con una combinación de anticuerpos anti-EGFR y anti-HER2 conjugados con epirubicina. Patel D, et al., 2009. International Journal of Oncology. 34(1):25-32 se refiere a un estudio del efecto *in vitro* e *in vivo* de cetuximab sobre las células tumorales humanas que expresan EGFR y HER2. El documento WO2007/077028 A2 se refiere al tratamiento de combinación con un anticuerpo anti-EGFR Erbitux y un anticuerpo anti-HER3 (U1-53 o U1-59) en un modelo de xenoinjerto BxPC3. El documento WO2010/108127 se refiere a un tratamiento de combinación con un anticuerpo anti-EGFR D1.5 y un anticuerpo anti-HER3 DL3.6 en un modelo de xenoinjerto HCA-7.

El documento WO00/78347 se refiere a un tratamiento de combinación de células cancerosas con los anticuerpos anti-HER2 y anti-HER3. Huhlov A, et al., 2010. Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. 51(1):845-846 se refiere a un tratamiento de combinación de células cancerosas BT474 con el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab y un anticuerpo biespecífico anti-HER/HER3.

Pedersen MW, et al., 2010. Cancer Research. 70(2):588-597 se refiere a una composición sinérgica de dos anticuerpos anti-EGFR para su uso en el tratamiento del cáncer. WO2008/104183 se refiere al uso de al menos tres moléculas de anticuerpos anti-EGFR distintas para mejorar el tratamiento terapéutico. Friedmann LM, et al., 2005. Proceedings of the National Academy of Sciences. 102(6):1915-1920 se refiere a la inhibición sinérgica de la multiplicación de células cancerosas usando dos anticuerpos anti-EGFR o dos anticuerpos anti-HER2. El documento WO2008/031531 se refiere a una composición que comprende pertuzumab y trastuzumab para el tratamiento del cáncer resistente a trastuzumab.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a agentes terapéuticos mejorados contra los receptores de la familia HER que más interfieren con los múltiples miembros de la familia de HER (inhibición de pan-HER). Más particularmente, la

invención se refiere al uso de las composiciones de anticuerpo en carcinoterapia humana, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de pulmón y otros cánceres con dependencia de uno o más de los receptores EGFR, HER2 y HER3. En comparación con los tratamientos actualmente disponibles para tales cánceres, incluyendo los anticuerpos monoclonales y combinaciones de anticuerpos disponibles, así como moléculas pequeñas dirigidas contra los receptores de la familia HER, se contempla que la composición del anticuerpo de la invención pueda proporcionar una respuesta clínica superior ya sea sola u opcionalmente en combinación con otros tratamientos tales como la quimioterapia.

En la presente memoria se describe una composición de anticuerpo recombinante, en la que al menos una molécula de anticuerpo anti-HER, distinta, se une a un antígeno de un primer receptor de la familia HER y al menos una molécula de anticuerpo anti-HER distinta, se une a un antígeno de un segundo receptor de la familia HER.

En la presente memoria se describe también una composición de anticuerpo recombinante, en la que al menos una molécula de anticuerpo anti-HER distinta, se une a un antígeno de un primer receptor de la familia HER y al menos una molécula de anticuerpo anti-HER distinta, se une a un antígeno de un segundo receptor de la familia HER y al menos una molécula de anticuerpo anti-HER distinta, se une a un antígeno de un tercer receptor de la familia HER.

En la presente memoria se describe una composición de anticuerpo recombinante, en la que la composición comprende al menos un anticuerpo anti-EGFR con las CDR de, o que son capaces de inhibir la unión de y/o que se unen al mismo epítipo, que 1254, 1277 o 1565; al menos un anticuerpo anti-HER2 con los CDR de, o que son capaces de inhibir la unión de y/o que se unen al mismo epítipo que, 4384, 4385, 4517 o 4518; y al menos un anticuerpo anti-HER3 con las CDR de, o que es capaz de inhibir la unión de y/o que se unen al mismo epítipo que, 5038 o 5082. La invención se refiere a una composición farmacéutica de anticuerpos que comprende anticuerpos con las CDR de los anticuerpos 1277+1565+4384+4517+5038+5082.

En particular, la invención se refiere a una composición farmacéutica de anticuerpo que comprende: a) una primera molécula de anticuerpo anti-EGFR que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 73-75, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 118-120, respectivamente, y una segunda molécula de anticuerpo anti-EGFR que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 76-78, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 121-123, respectivamente; b) una primera molécula de anticuerpo anti-HER2 que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 82-84, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 127-129, respectivamente, y una segunda molécula de anticuerpo anti-HER2 que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 88-90, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 133-135, respectivamente, y c) una primera molécula de anticuerpo anti-HER que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 97-99, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 142-144, respectivamente, y una segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 100-102, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 145-147, respectivamente.

En una realización, la composición de anticuerpo comprende a) una primera molécula de anticuerpo anti-EGFR que comprende las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO: 18 y 20, respectivamente, y una segunda molécula de anticuerpo anti-EGFR que comprende las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO: 22 y 24, respectivamente; b) una primera molécula de anticuerpo anti-HER2 que comprende las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO: 30 y 32, respectivamente, y una segunda molécula de anticuerpo anti-HER2 que comprende las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO: 38 y 40, respectivamente; y c) una primera molécula de anticuerpo anti-HER3 que comprende las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO: 50 y 52, respectivamente, y una segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 que comprende las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO: 54 y 56, respectivamente.

En otra realización, la composición de anticuerpo comprende una primera molécula de anticuerpo anti-EGFR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; una segunda molécula de anticuerpo anti-EGFR que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; una primera molécula de anticuerpo anti-HER2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 y una segunda molécula de anticuerpo anti-HER2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; una primera molécula de anticuerpo anti-HER3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y una segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

Las composiciones de anticuerpos representativas de la invención han demostrado ser efectivas en la inhibición de la proliferación de líneas de células cancerosas, representativas, lo cual es indicativo de un uso *in vivo* en el tratamiento del cáncer. Estos resultados indicativos han sido confirmados en un modelo de xenoinjerto de cáncer humano en ratones.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un inmunoconjugado que comprende una composición de anticuerpo recombinante de la invención, conjugado con un agente anticanceroso.

5 En la presente memoria se describen moléculas de ácido nucleico que codifican para los anticuerpos de la invención, los vectores de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos y las células hospedadoras que comprenden dichos ácidos nucleicos o vectores de expresión.

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir una composición de anticuerpo de la invención que comprende proporcionar células hospedadoras capaces de expresar una molécula de anticuerpo de la composición, cultivar dichas células hospedadoras en condiciones apropiadas para la expresión de las moléculas de anticuerpo y aislar las moléculas de anticuerpo resultantes.

15 En un aspecto adicional más, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una composición de anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además, la invención se refiere a la composición de anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer.

20 En un aspecto adicional más, la invención se refiere a una composición de anticuerpo de la invención para su uso como un medicamento, para su uso en el tratamiento del cáncer y/o para su uso en el tratamiento del cáncer en un ser humano u otro mamífero que tiene resistencia adquirida al tratamiento con anticuerpos y/o TKI.

25 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un artículo farmacéutico que comprende una composición de anticuerpo de la invención y al menos un compuesto quimioterapéutico o antineoplásico como una combinación para la administración simultánea, individual o sucesiva en carcinoterapia. Es probable que la composición de anticuerpo de la invención pueda ser utilizada para un tratamiento de segunda línea, es decir, después o simultáneamente con el tratamiento utilizando los agentes quimioterapéuticos o antineoplásicos convencionales, o después o simultáneamente con la radioterapia y/o la cirugía.

30 Descripción de los dibujos

35 Figura 1A) Actividad metabólica de las células A431NS tratadas con diferentes concentraciones de los anticuerpos y mezclas de anticuerpos indicados durante 96 horas. B) Actividad metabólica de las células NCI-N87 tratadas con diferentes concentraciones de los anticuerpos y mezclas de anticuerpos indicados durante 96 horas. C) Actividad metabólica de las células MCF7 tratadas con diferentes concentraciones de los anticuerpos y mezclas de anticuerpos indicados en presencia de herregulina beta 10 nM durante 96 horas.

40 Figura 2: Actividad metabólica de las células A431NS tratadas con diferentes concentraciones de las mezclas indicadas durante 96 horas.

Figura 3: Actividad metabólica de las células MCF7 tratadas con diferentes concentraciones de las mezclas de anticuerpo indicadas durante 96 horas.

45 Figura 4: Actividad metabólica de las células NCI-N87 tratadas con diferentes concentraciones de las mezclas de anticuerpo indicadas, en presencia de herregulina beta 10 nM durante 96 horas.

50 Figura 5: Actividad metabólica de las células A431NS tratadas con diferentes concentraciones de las mezclas de anticuerpo indicadas y anticuerpos monoclonales de referencia cetuximab y trastuzumab durante 96 horas, las células NCI-N87 tratadas con diferentes concentraciones de las mezclas de anticuerpo indicadas y los anticuerpos monoclonales de referencia cetuximab y trastuzumab durante 96 horas y las células MCF7 tratadas con diferentes concentraciones de las mezclas de anticuerpo indicadas y los anticuerpos monoclonales de referencia cetuximab y trastuzumab, en presencia de herregulina beta 10 nM durante 96 horas.

55 Figura 6: Nivel máximo de inhibición del crecimiento de las líneas celulares indicadas, tratadas durante 96 horas con 2 µg/ml de los anticuerpos y mezclas de anticuerpos indicados.

60 Figura 7: Análisis de transferencia Western de los niveles de EGFR, HER2 y HER3 en las líneas celulares HN5, NCI-N87 y MCF7 después del tratamiento durante toda la noche con los anticuerpos y mezclas de anticuerpos indicados.

Figuras 8-12: Titulaciones que muestran el efecto de las diferentes mezclas de anticuerpos sobre el crecimiento y proliferación de las líneas celulares cancerosas A4 31NS (dependiente de EGFR), H358 (dependiente de EGFR), HCC202 (dependiente de HER2), OE19 (dependiente de HER2) y H820 (dependiente de EGFR).

65 Figura 13: Análisis de transferencia Western de los niveles de EGFR, HER2 y HER3 en las líneas celulares H292 y OVCAR-8 después del tratamiento durante toda la noche con los anticuerpos y mezclas de anticuerpos

indicados.

5 Figuras 14-20: Titulaciones que muestran el efecto de las diferentes mezclas de anticuerpos y anticuerpos sobre el crecimiento y la proliferación de las líneas celulares cancerosas OE19, BT474, MDA-MB-175-VII, HCC202, N87, A431NS y A549.

Figuras 21-25: Titulaciones que muestran el efecto de las diferentes mezclas de anticuerpos y anticuerpos sobre el crecimiento y proliferación de las líneas celulares cancerosas A431NS, H1975, HCC202, AU565 y H358.

10 Figura 26: Efecto inhibitorio de crecimiento de las diferentes mezclas de anticuerpos y anticuerpos en el modelo de xenoinjerto de tumor humano A431NS.

Descripción detallada de la invención

15 *Definiciones*

El término “anticuerpo” o “molécula de anticuerpo” describe un componente funcional del suero y es a menudo referido como una colección de moléculas (anticuerpos o inmunoglobulina) o como una molécula (la molécula de anticuerpo o la molécula de inmunoglobulina). Un anticuerpo es capaz de unirse a o reaccionar con un determinante antigénico específico (el antígeno o el epítipo antigénico), el cual a su vez puede conducir a la inducción de los mecanismos efectores inmunológicos. Un anticuerpo individual se considera habitualmente como mono-específico, y una composición de anticuerpos puede ser monoclonal (es decir, que consiste en moléculas de anticuerpos idénticas) o policlonal (por ejemplo, que consiste en dos o más diferentes anticuerpos que reaccionan con el mismo o diferentes epítopos sobre el mismo antígeno, o incluso sobre antígenos distintos y diferentes). Cada anticuerpo tiene una estructura única que hace posible que éste se una específicamente a su antígeno correspondiente, y todos los anticuerpos naturales tienen la misma estructura básica general de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Los anticuerpos son también conocidos colectivamente como inmunoglobulinas.

Los términos “anticuerpo” o “anticuerpos” como se utilizan en la presente memoria, están también destinados a incluir los anticuerpos quiméricos y de cadena simple, así como los fragmentos de unión de los anticuerpos, tales como los fragmentos Fab, Fv o los fragmentos Fv de cadena simple (scFv), así como las formas multiméricas tales como las moléculas de IgA díméricas o de IgM pentavalente. También se incluyen los miméticos de anticuerpo. Un anticuerpo puede ser de origen humano o no humano, por ejemplo un anticuerpo murino o derivado de otro roedor, o un anticuerpo quimérico, humanizado o reconformado basado por ejemplo, en un anticuerpo murino. Cada cadena pesada de un anticuerpo incluye generalmente una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada incluye generalmente tres dominios, denominados como CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera de anticuerpo incluye generalmente una región variable de la cadena ligera (VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera incluye generalmente un dominio simple, denominado CL. Las regiones VH y VL pueden estar además subdivididas en regiones de hipervariabilidad (“regiones hipervariables”, las cuales pueden ser hipervariables en secuencias y/o en lazos estructuralmente definidos). Éstas son también denominadas como regiones de determinación de la complementariedad (CDR), las cuales están intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL incluye generalmente tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Los restos de aminoácidos en las regiones variables a menudo se numeran utilizando un método de numeración convencional conocido, tal como el esquema de numeración de Kabat (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Edición. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

50 Cuando se dice que un anticuerpo “deriva de” o “se basa en” un anticuerpo específico descrito en la presente memoria, esto significa que el anticuerpo “derivado” comprende, dependiendo del contexto particular, uno de las siguientes: la secuencia de CDR3 de la cadena pesada de dicho anticuerpo especificado; la secuencia de CDR3 de la cadena pesada y la secuencia de CDR3 de la cadena ligera de dicho anticuerpo especificado; las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de dicho anticuerpo especificado; o la secuencia de la región variable de la cadena pesada y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo especificado, o una variante humanizada y/o madurada por afinidad de dicha secuencia de la región variable de cadena pesada y/o secuencia de la región variable de la cadena ligera, o una secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o la cadena ligera que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad en la secuencia, tal como al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad en la secuencia, con las respectivas secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera. Un anticuerpo que es derivado de o basado en un anticuerpo especificado descrito en la presente memoria en general se unirá al mismo epítipo que dicho anticuerpo especificado, y mostrará Preferiblemente sustancialmente la misma actividad que dicho anticuerpo especificado. Se considera que un anticuerpo se une al mismo epítipo de HER que el anticuerpo especificado si éste compete por la unión con dicho anticuerpo especificado.

65 La especificidad de interacción de un anticuerpo con un antígeno diana, radica principalmente en los restos de aminoácidos localizados en las seis CDR de la cadena pesada y ligera. Las secuencias de aminoácidos dentro de

las CDR son por lo tanto mucho más variables entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de un anticuerpo de origen natural, específico, o más en general cualquier anticuerpo específico con una secuencia de aminoácidos dada, por la construcción de vectores de expresión que expresan las secuencias de CDR provenientes del anticuerpo específico injertado dentro de las secuencias estructurales provenientes de un anticuerpo diferente. Como resultado, es posible “humanizar” un anticuerpo no humano y seguir manteniendo sustancialmente la especificidad y la afinidad de unión del anticuerpo original. Más adelante se ofrece una discusión más detallada de la humanización.

Un “anticuerpo quimérico” se refiere en su sentido más amplio a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones provenientes de uno o más de otros anticuerpos. Como se utiliza en la presente memoria, un “anticuerpo quimérico” es en general un anticuerpo que es parcialmente de origen humano y parcialmente de origen no humano, es decir, derivado en parte de un animal no humano, por ejemplo un ratón u otro roedor, o un ave tal como un pollo. Los anticuerpos quiméricos son preferidos sobre los anticuerpos no humanos con el fin de reducir el riesgo de una respuesta anti-anticuerpo humano, por ejemplo, una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón en el caso de un anticuerpo murino. Un ejemplo de un anticuerpo quimérico típico es uno en que las secuencias de la región variable son secuencias murinas derivadas de la inmunización de un ratón, mientras que las secuencias de la región constante son humanas. En el caso de un anticuerpo quimérico, las partes no humanas, es decir, generalmente las regiones estructurales de las secuencias de la región variable pueden ser alteradas adicionalmente con el fin de humanizar el anticuerpo.

El término “humanizar” se refiere al hecho de que si un anticuerpo es total o parcialmente de origen no humano, por ejemplo un anticuerpo murino obtenido a partir de la inmunización de ratones con un antígeno de interés o un anticuerpo quimérico basado en tal anticuerpo murino, es posible reemplazar ciertos aminoácidos, en particular en las regiones estructurales y los dominios constantes de las cadenas pesadas y ligeras, con el fin de evitar o reducir al mínimo una respuesta inmunitaria en humanos. Se sabe que todos los anticuerpos tienen el potencial de provocar una respuesta humana anti-anticuerpo, lo cual se correlaciona en cierto grado con el grado de “carácter humano” del anticuerpo en cuestión. Aunque no es posible predecir de manera precisa la inmunogenicidad y con esto la respuesta del anticuerpo humano contra un anticuerpo particular, los anticuerpos no humanos tienden a ser más inmunogénicos que los anticuerpos humanos. Los anticuerpos quiméricos, donde las regiones constantes, extrañas (usualmente de roedor) han sido reemplazadas con secuencias de origen humano, han demostrado que son en general menos inmunogénicos que los anticuerpos de origen completamente extraño, y la tendencia en los anticuerpos terapéuticos es hacia los anticuerpos humanizados o completamente humanos.

Para los anticuerpos quiméricos u otros anticuerpos de origen no humano, se prefiere por lo tanto que éstos sean humanizados para reducir el riesgo de una respuesta humana anti-anticuerpo. Para los anticuerpos quiméricos la humanización generalmente implica la modificación de las regiones estructurales de las secuencias de la región variable. Los restos de aminoácidos que son parte de una región de determinación de la complementariedad (CDR) generalmente no serán alterados en conexión con la humanización, aunque en ciertos casos puede ser deseable alterar los restos de aminoácidos de CDR individuales, por ejemplo para eliminar un sitio de glucosilación, un sitio de desamidación o un resto de cisteína no deseado. La N-glucosilación ocurre mediante el acoplamiento de una cadena de oligosacárido a un resto de asparagina en la secuencia tripeptídica Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. La eliminación de un sitio de N-glucosilación puede ser lograda mediante la mutación ya sea del resto de Asn como del resto de Ser/Thr en un resto diferente, Preferiblemente por medio de sustitución conservadora. La desamidación de los restos de asparagina y glutamina puede ocurrir dependiendo de factores tales como el pH y la exposición superficial. Los restos de asparagina son particularmente susceptibles a la desamidación, principalmente cuando están presentes en las secuencias Asn-Gly y en un grado menor en otras secuencias dipeptídicas tales como Asn-Ala. Cuando tal sitio de desamidación, en particular Asn-Gly, está presente en una secuencia de CDR, puede ser por lo tanto deseable eliminar el sitio, generalmente mediante sustitución conservadora para eliminar uno de los restos implicados. La sustitución en una secuencia de CDR para eliminar uno de los restos implicados está también destinada a ser abarcada por la presente invención.

En la técnica se conocen numerosos métodos para la humanización de una secuencia de anticuerpo; ver por ejemplo la revisión por Almagro y Fransson (2008) *Front Biosci.* 13: 1619-1633. Un método comúnmente utilizado es el injerto de CDR, el cual por ejemplo para un anticuerpo quimérico derivado murino implica la identificación de las contrapartes de genes humanos de la línea germinal de los genes de la región variable murina y el injerto de las secuencias de CDR murinas dentro de esta estructura. El injerto de CDR puede estar basado en las definiciones de CDR de Kabat, aunque una publicación reciente (Magdelaine-Beuzelin et al. (2007) *Crit Rev. Oncol Hematol.* 64:210-225) ha sugerido que la definición de IMGT (www.imgt.org) puede mejorar el resultado de la humanización. Ya que el injerto de CDR puede reducir la especificidad y la afinidad de unión y de este modo la actividad biológica, de un anticuerpo no humano injertado con CDR, pueden ser introducidas retromutaciones en posiciones seleccionadas del anticuerpo injertado con CDR, con el fin de conservar la especificidad y afinidad de unión del anticuerpo progenitor. La identificación de las posiciones para las posibles retromutaciones puede ser realizada utilizando información disponible en la literatura y en las bases de datos del anticuerpo. Los restos de aminoácidos que son candidatos para las retromutaciones son generalmente aquellos que están localizados en la superficie de una molécula de anticuerpo, mientras que los restos que están enterrados o que tienen un bajo grado de exposición

superficial normalmente no serán alterados. Una técnica de humanización alternativa al injerto con CDR y la retromutación es la reconformación superficial, en la cual los restos no expuestos superficialmente de origen no humano son retenidos, mientras que los restos superficiales son alterados a restos humanos.

5 En ciertos casos, puede ser también deseable alterar uno o más restos de aminoácidos de CDR con el fin de mejorar, la afinidad de unión al epítipo diana. Esto es conocido como "maduración por afinidad" y puede ser realizado opcionalmente en conexión con la humanización, por ejemplo en situaciones donde la humanización de un anticuerpo induce especificidad o afinidad de unión reducida y no es posible mejorar suficientemente la especificidad o la afinidad de unión por retromutaciones únicamente. Diversos métodos de maduración por afinidad son conocidos
10 en la técnica, por ejemplo, el método de mutagénesis de saturación de barrido *in vitro*, descrito por Burks et al. (1997) PNAS USA, vol. 94, pp. 412-417 y el método de maduración de afinidad *in vitro*, gradual de Wu et al. (1998) PNAS USA, vol. 95 pp. 6037-6.042.

15 Como se ha señalado anteriormente, la presente invención abarca el uso de anticuerpos humanizados, es decir, anticuerpos que por lo demás han sido sometidos a humanización. Estos pueden ser también denominados como "variantes humanizadas" de un anticuerpo de la invención. En particular, las expresiones "secuencia de la región variable de la cadena pesada" y "secuencia de la región variable de la cadena ligera" como se utilizan en la presente memoria con referencia a cualquier secuencia de aminoácidos específica están destinados a abarcar no solamente esta secuencia específica sino también cualquier variante humanizada de la misma. Las variantes maduradas por
20 afinidad de los anticuerpos anti-HER descritos en la presente memoria también están destinadas a ser abarcadas por la presente invención.

25 Como se utiliza en la presente memoria, una referencia a una secuencia de la región variable de la cadena pesada o una secuencia de la región variable de la cadena ligera con un nivel mínimo particular de identidad de secuencia comparado a una secuencia de la región variable de la cadena pesada o de la cadena ligera, específica, por ejemplo, que tiene al menos 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de referencia, tal como al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de la secuencia, está destinada a incluir, pero no está limitada a, las variantes humanizadas y/o maduradas por afinidad de tal secuencia de referencia.

30 El término "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que es expresado a partir de una célula o línea celular transfectada con un vector de expresión (o posiblemente más de un vector de expresión, generalmente dos vectores de expresión) que comprende la secuencia de codificación del anticuerpo, donde dicha secuencia de codificación no está naturalmente asociada con la célula.

35 El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico dentro de la cual una secuencia de ácido nucleico puede ser insertada para el transporte entre los diferentes ambientes genéticos y/o para la expresión en una célula hospedadora. Un vector que lleva elementos reguladores para la transcripción de la secuencia de ácido nucleico (al menos un promotor adecuado) es denominado como "un vector de expresión". Los términos "plásmido" y "vector" pueden ser utilizados indistintamente. Los vectores de expresión utilizados en el contexto de la presente invención
40 pueden ser de cualquier tipo adecuado, conocido en la técnica, por ejemplo, un plásmido o un vector viral.

45 Las expresiones "anticuerpo policlonal" o "mezcla de anticuerpos [monoclonales]" se refieren a una composición de dos o más moléculas de anticuerpo diferentes que son capaces de unirse a o reaccionar con diferentes determinantes antigénicos específicos sobre el mismo o sobre diferentes antígenos. En el contexto de la presente invención, los anticuerpos individuales de un anticuerpo policlonal se unen a diferentes determinantes antigénicos de la familia de HER. Preferiblemente los anticuerpos individuales de un anticuerpo policlonal usado en la invención se unen a diferentes epítomos de la familia de HER, más preferiblemente a epítomos distintos y sustancialmente no solapados. Se piensa en general que la variabilidad de un anticuerpo policlonal está localizada en las regiones variables de las moléculas de anticuerpo.

50 Es bien sabido en la técnica que existen anticuerpos como diferentes isotipos, tales como los isotipos humanos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 o los isotipos murinos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA. Un anticuerpo usado en la invención puede ser de cualquier isotipo. Aunque es posible que los anticuerpos individuales de una composición de anticuerpo policlonal de la invención incluyan anticuerpos de más de un isotipo, éstos son preferiblemente todos del mismo isotipo.
55

60 La expresión "dependencia de HER" se refiere a una célula cancerosa con dependencia de uno o más receptores de la familia HER para mantener las propiedades malignas tales como la proliferación, el crecimiento, la motilidad, la invasión, la supervivencia y/o la quimiorresistencia. La dependencia puede ser provocada por la sobreexpresión del receptor, las mutaciones del receptor, la producción de factores de crecimiento autocrinos y/o la reticulación con otros sistemas receptores.

65 El término "pan-HER" o la expresión "composición de anticuerpo pan-HER" se refieren a una composición de moléculas de anticuerpo que son capaces de unirse a al menos dos diferentes antígenos sobre al menos dos receptores de la familia HER. En el contexto de la presente invención, los anticuerpos individuales de una composición de anticuerpo se unen a diferentes determinantes antigénicos de la familia HER. Preferiblemente, los

anticuerpos individuales de la composición de anticuerpo se unen a EGFR y HER2, EGFR y HER3, HER2 y HER3 o EGFR, HER2 y HER3, respectivamente.

El término "HER" significa "Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano" como se describe anteriormente en la sección de "Antecedentes de la invención" y se utiliza indistintamente con el término "ErbB" para caracterizar el subgrupo de los receptores tirosina quinasa (RTK) que consisten en los cuatro miembros EGFR/ErbB, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 y HER4/ErbB4. Conjuntamente, estos cuatro receptores constituyen los receptores de la "familia HER". Como se utilizan en la presente memoria, se pretende incluir las variantes, isoformas y homólogos de especie de HER.

El término "CDR" o "región de determinación de la complementariedad" se refiere a las regiones "hipervariables" existentes en los dominios variables de un anticuerpo que son principalmente responsables de la determinación de la especificidad de enlace del anticuerpo. Ver la definición de Lefranc et al. (2003), *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*, *Dev. Comp Immunol.* 27, 55-77. Cada una de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo contiene tres regiones CDR, denominadas como CDR1, CDR2 y CDR3, de las cuales CDR3 muestra la mayor variabilidad.

El término "epítipo" es utilizado para describir una parte de una molécula más grande (por ejemplo, antígeno o sitio antigénico) que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es una porción de una molécula más grande que provoca una respuesta de anticuerpo en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es una porción de una molécula más grande a la cual un anticuerpo se une inmunoespecíficamente como se determina por cualquier método conocido en la técnica. Los epítipos antigénicos no son necesariamente inmunogénicos. Un antígeno es una sustancia a la cual se une inmunoespecíficamente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, por ejemplo, una toxina, virus, bacteria, proteína o ADN. Un antígeno o sitio antigénico a menudo tiene más de un epítipo, a no ser que éste sea muy pequeño y es a menudo capaz de estimular una respuesta inmunitaria. Los epítipos pueden ser lineales o conformacionales. Un epítipo lineal consiste en general en aproximadamente 6 a 10 aminoácidos adyacentes sobre una molécula de proteína que son reconocidos por un anticuerpo. Por el contrario, un epítipo conformacional consiste en los aminoácidos que no están dispuestos secuencialmente, pero donde un anticuerpo reconoce una estructura tridimensional particular. Cuando una molécula de proteína se pliega en una estructura tridimensional, los aminoácidos que forman el epítipo están yuxtapuestos, permitiendo que el anticuerpo reconozca el epítipo conformacional. En una proteína desnaturalizada, únicamente son reconocidos los epítipos lineales. Un epítipo conformacional, por definición, debe estar sobre la parte externa de la proteína plegada.

El término "epítipos distintos" se refiere al hecho de que cuando dos anticuerpos diferentes de la invención se unen a distintos epítipos, existe menos de 100 % de competencia por la unión al antígeno, preferiblemente menos de 80 % de competencia por la unión al antígeno, más preferiblemente menos de 50 % de competencia por la unión al antígeno y lo más preferiblemente tan poca competencia como sea posible, tal como menos de aproximadamente 25 % de competencia por la unión al antígeno. Los anticuerpos capaces de competir entre sí por la unión al mismo antígeno pueden unirse al mismo epítipo o a epítipos solapantes, o pueden tener un sitio de unión muy cercano uno con el otro, de modo que la competencia es principalmente provocada por impedimento estérico. Un análisis de "epítipos distintos" de los pares de anticuerpo puede ser realizado mediante métodos conocidos en la materia, por ejemplo por medio de los experimentos de unión en condiciones de saturación del anticuerpo utilizando FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) u otro análisis de citometría de flujo en células que expresan las familias HER y los anticuerpos marcados fluorescentemente, individuales, o mediante Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) utilizando el antígeno de la familia HER capturado o conjugado con una superficie de la celda de flujo. En los ejemplos se describe un método para determinar la competencia entre los anticuerpos utilizando SPR.

Los distintos epítipos son preferiblemente "no solapantes" en el sentido de que dos diferentes anticuerpos anti-HER en una composición de la invención tienen una competencia suficientemente baja para el enlace al antígeno de modo que los dos anticuerpos son capaces de unirse con sus respectivos epítipos de manera simultánea. Los expertos en la técnica entenderán que pueden existir diferentes grados de solapamiento y que los epítipos distintos pueden ser considerados como "no solapantes" a pesar de la presencia de algún grado de solapamiento, siempre y cuando los anticuerpos respectivos sean capaces de unirse sustancialmente a sus epítipos. Se considera en general que este es el caso cuando la competencia por la unión al antígeno entre los dos anticuerpos es menor de aproximadamente 50 %.

De manera similar, un anticuerpo que "compite por la unión" con un anticuerpo de la divulgación, puede ser definido como uno que muestra competencia por la unión al antígeno de aproximadamente 50 % o más.

Los anticuerpos que se unen a diferentes epítipos sobre el mismo antígeno, pueden tener diferentes efectos sobre la actividad del antígeno al cual se unen, dependiendo de la localización del epítipo. Un anticuerpo que se une a un epítipo en un sitio activo del antígeno puede bloquear la acción del antígeno completamente, mientras que otro anticuerpo que se une a un epítipo diferente puede tener ninguno o poco efecto sobre la actividad del antígeno solo. Tales anticuerpos pueden, no obstante, todavía activar el complemento y con esto dar como resultado la eliminación del antígeno, y puede dar como resultado efectos sinérgicos cuando son combinados con uno o más anticuerpos

que se unen en diferentes epítomos sobre el mismo antígeno. En el contexto de la presente invención, el epítomo es preferiblemente una porción del dominio extracelular de la familia HER. Los antígenos de la presente invención son preferiblemente proteínas de la familia HER, de dominio extracelular, polipéptidos o fragmentos de los mismos a los cuales se une inmunoespecíficamente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. El antígeno asociado a la familia HER puede también ser un análogo o derivado del dominio extracelular del polipéptido de HER o el fragmento del mismo, al cual se une inmunoespecíficamente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

El término "inmunoglobulina" es comúnmente empleado como una designación colectiva de la mezcla de anticuerpos encontrados en la sangre o el suero, pero puede también ser utilizado para designar una mezcla de anticuerpos derivados de otras fuentes.

La expresión "par de codificación de V_H y V_L análogo" describe un par original de secuencias de codificación de V_H y V_L contenidas dentro o derivadas de la misma célula productora de anticuerpo. De este modo, un par de V_H y V_L análogo representa el apareamiento de V_H y V_L originalmente presente en el donante del cual deriva dicha célula. La expresión "un anticuerpo expresado a partir de un par de codificación de V_H y V_L " indica que un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo se producen a partir de un vector, plásmido u otro polinucleótido que contiene la secuencia de codificación de V_H y V_L . Cuando un par de codificación de V_H y V_L análogo es expresado, ya sea como un anticuerpo completo o como un fragmento estable del mismo, éstos conservan la afinidad y especificidad de unión al anticuerpo, originalmente expresadas a partir de la célula de las derivan. Una biblioteca de pares análogos también recibe el nombre de repertorio o colección de pares análogos y puede mantenerse individualmente o combinarse.

Por "proteína" o "polipéptido" se entiende cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o la modificación post-traducciona. Las proteínas pueden existir como monómeros o como multímeros, comprendiendo dos o más cadenas polipeptídicas ensambladas, fragmentos de proteínas, polipéptidos oligopéptidos o péptidos.

La expresión "promotores cabeza con cabeza" se refiere a un par de promotores que están situados en estrecha proximidad, de modo que la transcripción de los dos fragmentos de genes, dirigida por los promotores, ocurre en direcciones opuestas. Los promotores cabeza con cabeza son también conocidos como promotores bi-direccionales.

El término "transfección" es utilizado en la presente memoria como un término amplio para introducir ADN extraño dentro de una célula. Se entiende que el término también abarca otros métodos equivalentes funcionales para la introducción de ADN extraño dentro de una célula, tal como por ejemplo, la transformación, infección, transducción o fusión de una célula donante y una célula aceptora.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "inhibe el crecimiento" (por ejemplo, con referencia a las células) está destinado a incluir cualquier disminución mensurable en la proliferación (incremento en el número de células) o el metabolismo de una célula cuando se pone en contacto con la composición de anticuerpo de la invención, en comparación con el crecimiento de las mismas células en ausencia de dicha composición de anticuerpo, por ejemplo, la inhibición del crecimiento de un cultivo celular en al menos aproximadamente 10 % y preferiblemente más, tal como al menos aproximadamente 20 % o 30 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 40 % o 50 %, tal como al menos aproximadamente 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % o incluso 100 %.

El término "tratamiento" como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la administración de una composición de anticuerpo de la invención en una cantidad suficiente para facilitar, reducir, mejorar o erradicar (curar) los síntomas o los estados de enfermedad. La administración de dos o más anticuerpos de la invención en general será por medio de la administración simultánea de los anticuerpos, preferiblemente en la forma de una composición que contiene todos los anticuerpos que van a ser utilizados para el tratamiento. Sin embargo, es también posible administrar dos o más anticuerpos de la invención de manera individual. Las referencias en la presente memoria, a la administración de una composición de anticuerpo recombinante que comprende al menos dos anticuerpos debe por lo tanto entenderse que abarca no solamente la administración de una composición que comprende al menos dos anticuerpos como tales, sino también la administración individual de los anticuerpos. Las combinaciones de dos o más anticuerpos de la invención pueden de este modo administrarse de manera simultánea, secuencial o individual.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias, por ejemplo, las secuencias de la región variable, se refiere al número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (calculado como el número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta los espacios vacíos que deben ser introducidos para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias pueden lograrse utilizando software fácilmente disponible. Los programas de software adecuados están disponibles de varias fuentes, para el uso en línea y para descarga, y para la alineación de las secuencias de proteína y de nucleótidos. Un programa adecuado es ClustalW (Thompson et al. (1994) Nucleic Acids Res. 11; 22 (22):4673-80), disponible en www.clustal.org, o bien, por ejemplo, del European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk), que también proporciona diversas herramientas informáticas de proteínas y de nucleótidos. Cuando en la presente memoria se mencionan anticuerpos anti-EGFR específicos, por ejemplo, los anticuerpos denominados como 992, 1024, 1030, 1254 y 1277, estos números de anticuerpo en general se refieren

a los anticuerpos anti- EGFR descritos en el documento WO 2008/104183.

5 Cuando en la presente memoria se mencionan anticuerpos anti-HER2 específicos, por ejemplo, los anticuerpos denominados como 4382, 4384, 4385 y 4518, estos números de anticuerpo se refieren a los anticuerpos anti-HER2 descritos en el documento WO 2011/107957 A1.

10 Cuando en la presente memoria se mencionan anticuerpos anti-HER3 específicos, por ejemplo, los anticuerpos denominados como 4785, 5038, 5082 y 5096, estos números de anticuerpo se refieren a los anticuerpos anti-HER3 con las secuencias de ADN y de aminoácidos proporcionadas en el listado de secuencias.

10 *Mezclas de anticuerpo*

15 En la presente memoria se describe una composición de anticuerpo recombinante, es decir, una composición, en la que al menos una molécula de anticuerpo anti-HER distinta, se une a un antígeno de un primer receptor de la familia HER y al menos una molécula de anticuerpo anti-HER distinta, se une a un antígeno de un segundo receptor de la familia HER. Por ejemplo, una composición de anticuerpo recombinante es decir, una composición, en la que al menos una molécula de anticuerpo anti-HER distinta, se une a un antígeno de un primer receptor de la familia HER, al menos una molécula de anticuerpo anti-HER distinta, se une a un antígeno de un segundo receptor de la familia HER y al menos una molécula de anticuerpo anti-HER distinta, se une a un antígeno de un tercer receptor de la familia HER. La composición de anticuerpo puede comprender al menos una molécula de anticuerpo anti-HER distinta capaz de unirse a un antígeno de un primer receptor de la familia HER y al menos a dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER, capaces de unirse a un antígeno de un segundo receptor de la familia HER. En otra alternativa, la composición de anticuerpo puede comprender al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER capaces de unirse a un antígeno de un primer receptor de la familia HER y al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER capaces de unirse a un antígeno de un segundo receptor de la familia HER. En otra alternativa adicional, la composición de anticuerpo puede comprender al menos una molécula de anticuerpo anti-HER distinta, capaz de unirse a un antígeno de un primer receptor de la familia HER, al menos una molécula de anticuerpo anti-HER distinta, capaz de unirse a un antígeno de un segundo receptor de la familia HER y al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER que se unen a un antígeno de un tercer receptor de la familia HER. En otra alternativa adicional, la composición de anticuerpo comprende al menos una molécula de anticuerpo anti-HER distinta, capaz de unirse a un antígeno de un primer receptor de la familia HER, al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER capaces de unirse a un antígeno de un segundo receptor de la familia HER y al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER que se unen a un antígeno de un tercer receptor de la familia HER. En otra alternativa adicional preferida, la composición de anticuerpo comprende al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER capaces de unirse a un antígeno de un primer receptor de la familia HER, al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER capaces de unirse a un antígeno de un segundo receptor de la familia HER y al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER capaces de unirse a un antígeno de un tercer receptor de la familia HER.

40 El primero y el segundo receptores de la familia HER son preferiblemente EGFR y HER2, HER2 y EGFR, EGFR y HER3, HER3 y EGFR, HER2 y HER3, HER3 y HER2, respectivamente. En la alternativa donde las moléculas de anticuerpo se unen a tres diferentes receptores de la familia HER, el primero, el segundo y tercer receptor de la familia HER son preferiblemente EGFR y HER2 y HER3, EGFR y HER3 y HER2, HER2 y EGFR y HER3, HER2 y HER3 y EGFR, HER3 y EGFR y HER2, HER3 y HER2 y EGFR, respectivamente.

45 Los anticuerpos anti-HER distintos se unen a epítopos no solapantes sobre los receptores.

50 La naturaleza no solapante de los anticuerpos se determina preferiblemente utilizando anticuerpos marcados diferentemente en un análisis de FACS con las células que expresan HER o mediante el uso de la Resonancia de Plasmón Superficial utilizando el antígeno HER capturado o conjugado con una superficie de la celda de flujo. Una composición que se une a epítopos no solapantes puede ser utilizada contra una variedad más amplia de tipos de cánceres dependientes de HER, ya que puede ser menos vulnerable a las diferencias en la conformación de HER y menos vulnerable a las mutaciones en comparación con las composiciones de los anticuerpos monoclonales que se dirigen a uno o dos epítopos. Además, la composición de anticuerpo que se une a los epítopos no solapantes puede proporcionar eficacia superior en comparación con las composiciones que se dirigen a menos epítopos. En particular, la composición de anticuerpo puede proporcionar eficacia superior con respecto a la diferenciación terminal de las células cancerosas *in vivo*.

60 En la presente memoria se describe una composición de anticuerpo de la invención que tiene al menos dos moléculas de anticuerpo anti-HER distintas que se unen a un antígeno de un primer receptor de la familia HER y al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER que se unen a un antígeno de un segundo receptor de la familia HER. Como alternativa, las composiciones de anticuerpo que son capaces de unirse al menos a tres diferentes receptores de la familia de HER son más preferidas. Estas composiciones preferidas son descritas con más detalle más adelante conjuntamente con la descripción relacionada con el diseño de las composiciones de anticuerpo de la invención.

Los anticuerpos de la composición pueden ser anticuerpos quiméricos con cadenas variables no humanas y cadenas constantes humanas. Las cadenas variables no humanas pueden proceder de un ratón, rata, oveja, cerdo, pollo, primate no humano u otro animal adecuado. Con el fin de obtener anticuerpos completamente humanos, los anticuerpos pueden ser generados en un animal transgénico con genes de anticuerpo humano. Los anticuerpos pueden también ser anticuerpos humanizados como se describe anteriormente, donde las secuencias de CDR no humanas han sido injertadas dentro de las secuencias estructurales humanas.

Preferiblemente la cadena pesada de cada molécula de anticuerpo comprende una región constante IgG1 o IgG2 humana. Los anticuerpos en la composición pueden tener el mismo isotipo para facilitar la fabricación. Sin embargo, en algunos casos puede ser ventajoso incluir en la composición anticuerpos con diferentes isotipos. Las composiciones de anticuerpo pueden comprender anticuerpos capaces de unirse a un receptor de la familia HER, seleccionado del grupo que consiste en EGFR, HER2 y HER3 humanos, EGFR, HER2 y HER3 humanos mutados y variantes de delección de EGFR, HER2 y HER3 humanos. Los anticuerpos pueden ser capaces de unirse a EGFR, HER2 y/o HER3 humano y de primate no humano, de modo que éstos pueden ser probados en estudios relevantes de toxicología antes de los experimentos clínicos. El primate no humano puede ser un mono cinomolgo (*Macaca fascicularis*).

Los resultados obtenidos con las líneas de células cancerosas A431NS y MCF7 (Ejemplo 3) han mostrado que las combinaciones de las mezclas de anti-EGFR y las mezclas de anti-HER3 o anti-HER2 dan origen a incrementos sinérgicos en la inhibición del crecimiento de las células cancerosas y que una combinación de las mezclas contra los tres receptores es superior a las mezclas individuales y a las combinaciones de mezclas contra dos receptores.

La combinación de mezclas contra los tres receptores fue comparada con los anticuerpos monoclonales comercializados cetuximab (anti-EGFR) y trastuzumab (anti-HER2) y una mezcla de estos dos anticuerpos. Los resultados muestran que una combinación de una mezcla de anticuerpos contra los tres receptores EGFR, HER2 y HER3 es superior a cetuximab y a trastuzumab y también a una mezcla de estos dos anticuerpos en diferentes líneas celulares.

En general, los resultados han mostrado que la selección como diana óptima de más de uno de los receptores de la familia HER se obtiene combinando mezclas de anticuerpos contra cada receptor y que la selección como diana de tres receptores es superior a la selección como diana de dos receptores.

Los resultados obtenidos con las líneas celulares MCF7, HCC202, BT474, NCI-N87, MDA-MB-175, A431NS, HN5, H292, DU145 y MDA-MB-468 (Ejemplo 4) han mostrado también que la combinación de la mezcla de anti-EGFR y la mezcla de anti-HER2 inhibe todas las líneas celulares probadas. La selección como diana de únicamente uno de estos receptores da como resultado la inhibición de las líneas celulares que son dependientes de ese receptor particular. En general estos resultados muestran que una combinación de mezclas de anticuerpos contra EGFR y HER2 da un perfil inhibitorio mucho más amplio y puede de este modo al final ser utilizado para tratar pacientes cuyos tumores son dependientes de cualquiera de los receptores.

Los resultados del análisis de transferencia Western (Ejemplos 5 y 7) muestran que las mezclas de anticuerpos contra un único receptor (EGFR, HER2 y HER3) inducen la degradación de su respectiva diana y que una combinación de mezclas de anticuerpos contra cada diana es capaz de inducir degradación eficiente de los tres receptores de manera simultánea.

Los resultados obtenidos con las líneas celulares cancerosas A431NS, H358, HC202, OE19 y H820 (Ejemplo 6) muestran que aunque el efecto de las mezclas de anticuerpo y los anticuerpos individuales varía entre las diferentes líneas celulares, las mezclas de anticuerpos que contienen anticuerpos contra cada uno de estos tres receptores EGFR, HER2 y HER3, son en general eficaces en la inhibición del crecimiento y la proliferación celulares. Las mezclas que contienen seis anticuerpos, es decir, dos anticuerpos contra cada uno de los tres receptores, son en general las más eficaces en las diferentes líneas celulares.

Los resultados del Ejemplo 8 muestran que aunque el efecto de las mezclas de anticuerpo y los anticuerpos individuales varía entre las diferentes líneas celulares, las mezclas de anticuerpo comprendidas por tres, cuatro o seis anticuerpos contra los tres receptores EGFR, HER2 y HER3 son en general muy eficaces en la inhibición del crecimiento y la proliferación de las células cancerosas.

Los resultados del Ejemplo 9 demuestran que la selección como diana óptima de más de un receptor de la familia HER, se obtiene combinando las mezclas de los anticuerpos contra cada receptor, que la selección como diana de los tres receptores es superior a la selección como diana de dos receptores y que la selección como diana de cada receptor con una mezcla de anticuerpos es superior a la selección como diana de cada receptor con un único anticuerpo.

Finalmente, los resultados del experimento de eficacia *in vivo* (Ejemplo 10) muestran que el tratamiento de los xenoinjertos tumorales A431NS con una combinación de anticuerpos o mezclas de anticuerpos contra EGFR+HER3 o EGFR+HER2 +HER3 es más efectiva en comparación con la selección como diana de los tumores con

anticuerpos monoclonales y mezclas de anticuerpos contra los objetivos individuales EGFR, HER2 y HER3, o combinaciones de anticuerpos monoclonales y mezclas de anticuerpos contra EGFR+HER2 o HER2+HER3.

5 Lo que es evidente a partir de estos experimentos es que las combinaciones de los anticuerpos proporcionadas por los presentes inventores muestran eficacia contra una gama muy amplia de líneas de células cancerosas.

10 En la presente memoria se describen composiciones de anticuerpo que comprenden al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-EGFR, seleccionadas del grupo que consiste en anticuerpos capaces de inhibir la unión de y/o que se unen al mismo epítipo que un anticuerpo que tiene las CDR de los anticuerpos: 992, 1024, 1030, 1254, 1277 y 1565.

15 En la presente memoria se describen también composiciones de anticuerpo que comprenden al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-EGFR seleccionadas del grupo de combinaciones que consisten en los anticuerpos con las CDR de los anticuerpos: 992+1030, 992+1024, 1024+1030, 1030+1254, 1030+1277, 1030+1565, 1254+1277 y 1254+1565. En una realización particular, los anticuerpos anti-EGFR tienen las CDR de los anticuerpos 1277+1565.

20 En la presente memoria se describen también composiciones que comprenden al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER2 seleccionadas del grupo que consiste en anticuerpos capaces de inhibir la unión de y/o que se unen al mismo epítipo que un anticuerpo que tiene las CDR de los anticuerpos: 4382, 4384 4385, 4517 y 4518.

25 En la presente memoria se describen también composiciones de anticuerpo que comprenden al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER2 seleccionadas del grupo de combinaciones que consisten en los anticuerpos con las CDR de los anticuerpos: 4382+4384, 4382+4385, 4382+4517, 4382+4518, 4384+4385, 4384+4518, 4517+4518, y 4385+4518. En una realización particular, los anticuerpos anti-HER2 tienen las CDR de los anticuerpos 4384+4517.

30 En la presente memoria se describen composiciones de anticuerpo que comprenden al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER3 seleccionadas del grupo que consiste en anticuerpos capaces de inhibir la unión de y/o que se unen al mismo epítipo que un anticuerpo que tiene las CDR de los anticuerpos: 4785, 5038, 5082 y 5096.

35 En la presente memoria se describen también composiciones de anticuerpo que comprenden al menos dos moléculas distintas de anticuerpo anti-HER3 seleccionadas del grupo de combinaciones que consisten de los anticuerpos con las CDR de los anticuerpos: 4785+5038, 4785+5082, 4785+5096, 5038+5096 y 5082+5096. En una realización particular, los anticuerpos anti-HER3 tienen las mismas CDR de los anticuerpos 5038+5082.

40 En la presente memoria se describen composiciones de anticuerpo seleccionadas del grupo de combinaciones que consiste en los anticuerpos con las CDR de los anticuerpos:
 992+1024+4785+5082, 992+1024+4382+4385+4518, 992+1024+4382+4385+4518+4785+5082,
 4382+4385+4518+4785+5082, 1565+4517+5082, 1277+4517+5082, 1277+4384+5038, 1277+4384+5082,
 1277+1565+5038+5082, 1277+1565+4384+4517, 4384+4517+5038+5082,
 1277+4384+4517+5082, 1277+4384+4517+5038, 1277+1565+4384+4517+5038+5082 y
 1277+1565+4385+4518+5038+5082

45 En la presente memoria se describen composiciones de anticuerpo recombinante que comprenden las moléculas de anticuerpo como se definen, en las que la secuencia de la región variable de la cadena pesada y la secuencia de la región variable de la cadena ligera tiene cada una al menos 90 % de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95 % de identidad de secuencia, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia, con las secuencias de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera, respectivamente, de cualquiera de estos anticuerpos, y que compite por el enlace con el anticuerpo.

50 En la presente memoria se describen composiciones de anticuerpo que comprenden al menos un anticuerpo anti-EGFR con las CDR de, o que es capaz de inhibir la unión de y/o que se une al mismo epítipo, que 1254, 1277 o 1565; al menos un anticuerpo anti-HER2 con las CDR de, o que es capaz de inhibir la unión de y/o que se une al mismo epítipo, que 4384, 4385, 4517 o 4518; y al menos un anticuerpo anti-HER3 con las CDR de o que es capaz de inhibir la unión de y/o que se une al mismo epítipo que, 5038 o 5082.

60 En la invención, la composición de anticuerpo comprende dos anticuerpos dirigidos contra cada uno de EGFR, HER2 y HER3, en la que los anticuerpos anti-EGFR tienen las CDR de 1277+1565; los anticuerpos anti-HER2 tienen las CDR de 4384+4517 y los anticuerpos anti-HER3 tienen las CDR de 5038+5082.

65 En una realización preferida adicional, la composición de anticuerpo comprende anticuerpos con el dominio variable de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos 1277+1565+4384+4517+5038+5082.

En la presente memoria se describen composiciones de anticuerpo que comprenden anticuerpos con las CDR de los anticuerpos 1277+1565+4385+4518+5038+5082 o anticuerpos que son capaces de inhibir la unión de y/o se unen al mismo epítopo que dichos anticuerpos.

5 La Tabla 1 siguiente muestra los números de ID de secuencias, como se describen en el listado de secuencias anexo, para las secuencias de ADN y de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada (VH) y las cadenas ligeras (LC) de los anticuerpos 992, 1024, 1030, 1254, 1277, 1565, 4382, 4384, 4385, 4517, 4518, 4785, 5038, 5082 y 5096.

10 **Tabla 1: Números de ID de secuencia para las secuencias de ADN y de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y las cadenas ligeras de los anticuerpos anti-HER seleccionados**

Número de anticuerpo	VH Sec. de ADN	VH Sec. proteínas	LC Sec. de ADN	LC Sec. proteínas
992	1	2	3	4
1024	5	6	7	8
1030	9	10	11	12
1254	13	14	15	16
1277	17	18	19	20
1565	21	22	23	24
4382	25	26	27	28
4384	29	30	31	32
4385	33	34	35	36
4517	37	38	39	40
4518	41	42	43	44
4785	45	46	47	48
5038	49	50	51	52
5082	53	54	55	56
5096	57	58	59	60

15 Las Tablas 2 y 3 siguientes muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada (Tabla 2) y de la cadena ligera (Tabla 3) de los diversos anticuerpos anti-HER. Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera, que incluyen la región variable de la cadena ligera, de estos anticuerpos, así como las secuencias de ADN codificantes (optimizadas para la expresión en las células CHO) son proporcionadas en el listado de secuencias anexo. Ver Tabla 1 anterior para una visión general de los números de SEQ ID para estas secuencias.

20 **Tabla 2: Secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de los anticuerpos anti-HER seleccionados**

Número de anticuerpo	H CDR1	H CDR2	H CDR3	SEQ ID NO (CDR1/2/3)
992	GYTFTSYW	IYPGSRST	CTRNGDYVSSGDAMDYW	61-63
1024	GYTFTSHW	INPSSGRN	CVRYGYDEAMDYW	64-66
1030	GFTFSSYA	ISGVGST	CARGSDGYFYAMDYW	67-69
1254	GFAYSTYD	ISSGGDAA	CARSRYGNYGDAMDYW	70-72
1277	GFAFSYSD	MSSAGDVT	CVRHRDVAMDYW	73-75
1565	GYTFTSYW	INPSNGGT	CARDGGLYDGYDFW	76-78
4382	GYTFTDYY	INPNNGGT	CVPGGLRSYFDYW	79-81
4384	GYTFTSHW	INPSNGGT	CARAYYDFSWFVYW	82-84
4385	GYTFTGYW	ILPGSGST	ARWGDGFSFAY	85-87
4517	GFTFSSYG	ISGGGSYT	CARKGNYGNYGKLAYW	88-90
4518	GFNIKDIF	IDPANDNP	CAGGPAYFDYW	91-93
4785	GYSFTSYY	IYPGSGHT	CARPPYYSNYADVW	94-96
5038	GYSITSGFY	ISYDGSN	CARGGGYGNLFDYW	97-99
5082	GYSITSAYY	IGYDGRN	CSREGDYGYSDYW	100-102
5096	GYTFTSYL	INPYNDGA	CAREGDYVRYYGMDYW	103-105

Tabla 3: Secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de los anticuerpos anti-HER seleccionados

Número de anticuerpo	L CDR1	L CDR2	L CDR3	SEQ ID NO (CDR1/2/3)
992	QDIGNY	YTS	CQHYNTVPPTF	106-108
1024	KSLLSHNGITY	QMS	CAQNLLELPYTF	109-111
1030	KSVSTSGYSF	LAS	CQHSREFPLTF	112-114
1254	QSLVHSNGNTY	KVS	CSQNTHVYTF	115-117
1277	QSLVHSNGNTY	KVS	CSQSTHVPTF	118-120
1565	QDVDTA	WAS	CQQYSSYPLTF	121-123

Número de anticuerpo	L CDR1	L CDR2	L CDR3	SEQ ID NO (CDR1/2/3)
4382	QDVSA A	WAS	CQQHYTTPPTF	124-126
4384	QDISNY	YIS	CQQGNTLPLTF	127-129
4385	QNVGTA	STS	CQQYRSYPPTF	130-132
4517	ENIYSN	AAT	CQHFWGTPWTF	133-135
4518	QDVIAA	WAS	CQQHYSTPWTF	136-138
4785	QSLNLSGNQKNY	WAS	CQSDYSYPYTF	139-141
5038	QDISNY	HTS	CQQGITLPWTF	142-144
5082	QDINNY	YTS	CQQSETLPWTF	145-147
5096	QSVLYISNERNY	WAS	CHQHLSSYTF	148-150

Además, con el fin de ser capaces de realizar un estudio de toxicología en un primate no humano, es preferible que todos los anticuerpos en la composición se unan a un receptor de la familia ErbB humano, así como a al menos un receptor de la familia ErbB de primate adicional, tal como el ErbB de chimpancé (*Pan troglodytes*), mono Rhesus (*Macaca mulatta*), mono cinomolgo (*Macaca fascicularis*) u otros monos. El mono cinomolgo es un animal relativamente pequeño, y muy adecuado para los estudios de toxicología. Por lo tanto, el receptor adicional de la familia ErbB de primate es preferiblemente ErbB de cinomolgo. Preferiblemente, los anticuerpos se unen con aproximadamente la misma afinidad al ErbB humano y de primate no humano.

Una característica preferida adicional de los anticuerpos de las composiciones es la homogeneidad de las proteínas, de modo que los anticuerpos pueden ser purificados fácilmente. Para los miembros de anticuerpo individuales, se prefiere un perfil de cromatografía de intercambio iónico con un pico distinto para facilitar la caracterización. Un perfil de cromatografía de intercambio iónico claro es también preferido para facilitar la caracterización de la composición de anticuerpo final. Es también preferible cuando se combinan los anticuerpos que pueden ser distinguidos utilizando cromatografía de intercambio iónico, de modo que la composición con todos los anticuerpos pueda ser caracterizada en un análisis.

Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen tal como humano, murino, conejo, pollo, cerdo, llama, oveja y camello. Los anticuerpos pueden también ser quiméricos como se describe en los ejemplos o pueden ser humanizados, superhumanizados o versiones reconfiguradas de los mismos utilizando métodos bien conocidos descritos en la técnica.

Los anticuerpos pueden ser formulados en un envase para la administración. Sin embargo, éstos pueden ser fabricados, purificados y caracterizados individualmente y ser proporcionados en envases separados como un kit de partes, con un anticuerpo en cada envase. Como tales, éstos pueden administrarse de manera simultánea, sucesiva o individual.

En la presente memoria se describen también moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo de la invención, es decir, un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos 992, 1024, 1030, 1254, 1277, 1565, 4382, 4384, 4385, 4517, 4518, 4785, 5038, 5082 y 5096, o una variante humanizada de los mismos; o que codifica una secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o de la cadena ligera de tal anticuerpo, o una secuencia de la cadena pesada y/o ligera que tiene al menos 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de referencia, tal como al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con tal secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o ligera.

En la presente memoria se describen también vectores de expresión que comprenden una molécula de ácido nucleico como se define anteriormente. Como se ha señalado anteriormente, los vectores de expresión para el uso en el contexto de la presente invención pueden ser de cualquier tipo adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, un plásmido o un vector viral.

En la presente memoria se describen también células hospedadoras que comprenden una molécula de ácido nucleico como se define anteriormente, en las que la célula hospedadora es capaz de expresar un anticuerpo codificado por la molécula de ácido nucleico.

Producción de los anticuerpos de la invención y composiciones de anticuerpo

Un aspecto adicional de la invención se refiere a métodos para producir composiciones de anticuerpo que comprenden los anticuerpos de la invención. Una realización de este aspecto de la divulgación se refiere a un método para producir los anticuerpos como se definen en la presente memoria, que comprende proporcionar una célula hospedadora como se define anteriormente, capaz de expresar un anticuerpo, cultivar dicha célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y aislar el anticuerpo resultante.

En la presente memoria se describe también un método para producir una composición de anticuerpo recombinante que comprende anticuerpos anti-HER recombinantes como se describen en la presente memoria, comprendiendo el

método varias células, en el que cada célula es capaz de expresar un anticuerpo anti-HER recombinante, cultivar las células en condiciones adecuadas para la expresión de los anticuerpos y aislar los anticuerpos resultantes.

5 Un anticuerpo o composición de anticuerpo puede producirse por métodos en general conocidos en la técnica para la producción de los anticuerpos monoclonales o policlonales recombinantes. De este modo, en el caso de la producción de un solo anticuerpo de la invención, cualquier método conocido en la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes puede ser utilizado. Para la producción de una composición de anticuerpo de la invención, los anticuerpos individuales pueden producirse de manera individual, es decir, cada anticuerpo se produce en un biorreactor distinto o los anticuerpos individuales pueden producirse conjuntamente en un solo
10 biorreactor. Si la composición de anticuerpo es producida en más de un biorreactor, la composición purificada del anticuerpo anti-HER puede ser obtenida mediante la combinación de los anticuerpos obtenidos a partir de los sobrenadantes individualmente purificados provenientes de cada biorreactor. En el documento WO 2009/129814 se describen diversos procedimientos para la producción de una composición de anticuerpo policlonal en múltiples biorreactores, donde las líneas celulares o las preparaciones de anticuerpo son combinadas en un punto posterior en dirección 5' o antes de o durante el procesamiento dirección 3'.

En el caso de la producción de anticuerpos individuales en un solo biorreactor, esto puede ser realizado por ejemplo, como se describe en los documentos WO 2004/061104 o WO 2008/145133. El método descrito en el documento WO 2004/061104 está basado en la integración específica del sitio de las secuencias de codificación del anticuerpo dentro del genoma de las células hospedadoras individuales, asegurándose que las cadenas de proteína de V_H y V_L son mantenidas en su apareamiento original durante la producción. Además, la integración específica del sitio, reduce al mínimo los efectos de posición, y por lo tanto se espera que las propiedades de expresión y crecimiento en las células individuales en la línea de células policlonales sean muy similares. En general, el método implica lo siguiente: i) una célula hospedadora con uno o más sitios de reconocimiento de recombinasa; ii) un vector de expresión con al menos un sitio de reconocimiento de recombinasa compatible con aquel de la célula hospedadora; iii) la generación de una colección de vectores de expresión por transferencia de los pares de codificación de V_H y V_L seleccionados, a partir del vector de cribado a un vector de expresión, de tal modo que un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo puede ser expresado a partir del vector (tal transferencia puede no ser necesaria si el vector de cribado es idéntico al vector de expresión); iv) la transfección de la célula hospedadora con la colección de vectores de expresión y un vector que codifica una recombinasa capaz de combinar los sitios de reconocimiento de recombinasa en el genoma de la célula hospedadora con los del vector; v) la obtención/generación de una línea celular policlonal a partir de la célula hospedadora transfectada y vi) la expresión y recolección de la composición del anticuerpo a partir de la línea celular policlonal.

35 El documento 2008/145133 describe un procedimiento alternativo para la producción de anticuerpos en un único biorreactor. Este método implica la generación de una línea celular policlonal capaz de expresar un anticuerpo policlonal u otra proteína policlonal que comprende dos o más miembros distintos mediante a) la provisión de un grupo de vectores de expresión, en el que cada uno de dichos vectores comprende al menos una copia de un ácido nucleico distinto que codifica un miembro distinto de la proteína policlonal, transfectar por separado las células hospedadoras con cada uno de los vectores de expresión en condiciones que impidan la integración específica del sitio de los vectores de expresión dentro del genoma de las células, con lo cual se obtienen dos o más composiciones de células, expresando cada composición un miembro distinto de la proteína policlonal y c) mezclar las al menos dos composiciones de células para obtener una línea celular policlonal. Ambos métodos de los documentos WO 2004/061104 y WO 2008/145133 tienen la ventaja de permitir que todos los miembros que constituyen el anticuerpo policlonal recombinante sean producidos en un único biorreactor y sean purificados en un único proceso, con lo cual se evita la necesidad de la producción individual y los procesos de purificación para cada anticuerpo, dando al mismo tiempo como resultado una producción sorprendentemente uniforme de los diferentes anticuerpos. El método del documento WO 2008/145133 tiene la ventaja adicional de proporcionar un rendimiento incrementado, ya que cada célula de producción puede llevar múltiples copias del polinucleótido que codifica un anticuerpo particular.

Los anticuerpos para su uso en la invención pueden ser producidos en diversos tipos de células, incluyendo células de mamífero así como células eucariotas o procariotas, tales como células vegetales, células de insectos, células de levadura, hongos, *E. coli*, etc. Sin embargo, los anticuerpos son preferiblemente producidos en células de mamífero, por ejemplo las células CHO, células COS, células BHK, células de mieloma (por ejemplo, las células Sp2/0 o NSO), fibroblastos, tales como NIH 3T3 o células humanas inmortalizadas tales como las células HeLa, células HEK 293 o células PER.C6.

Los métodos para transfectar una secuencia de ácido nucleico dentro de una célula hospedadora son bien conocidos en la técnica (ver por ejemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición, 2001). Para la integración específica del sitio, por ejemplo como se describe en el documento WO 2004/061104 una célula hospedadora adecuada comprenderá uno o más sitios de reconocimiento de recombinasa en su genoma. En este caso, un vector de expresión adecuado comprende un sitio de reconocimiento de recombinación que se asemeja al o a los sitios de reconocimiento de recombinasa de la célula hospedadora. Los detalles adicionales concernientes por ejemplo, a la transferencia de los pares de codificación de V_H y V_L seleccionados provenientes de un vector de cribado utilizando el procedimiento de integración específica

del sitio, pueden consultarse en el documento WO 2004/061104.

Una composición de anticuerpo recombinante de la presente invención puede ser fabricada en un único biorreactor mediante el cultivo de una ampolla de un banco celular de trabajo policlonal (pWCB) en un medio apropiado durante un periodo de tiempo para permitir un nivel suficiente de expresión del anticuerpo manteniendo a la vez una uniformidad sustancial en los niveles de expresión relativos de los anticuerpos individuales expresados por la línea celular policlonal. Un tiempo de producción entre aproximadamente 15 y 50 días normalmente será adecuado. Se pueden usar los métodos de cultivo conocidos en la técnica tales como el método de lote alimentado o el cultivo de perfusión. El medio de cultivo es preferiblemente un medio libre de suero, más preferiblemente un medio libre de suero y libre de proteína, por ejemplo, un medio químicamente definido. Tales medios de cultivo son generalmente diseñados para el crecimiento del tipo celular particular que es utilizado para la producción y numerosas formulaciones de medios adecuados están comercialmente disponibles.

La composición de anticuerpo recombinante es obtenida a partir del medio de cultivo y purificada por técnicas de purificación convencionales. Estas pueden incluir, por ejemplo, la cromatografía de afinidad combinada con pasos de purificación subsecuentes tales como la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de interacción hidrófoba y la filtración en gel, ya que estas técnicas de purificación han sido utilizadas frecuentemente para la purificación de anticuerpos recombinantes. Cuando dos o más anticuerpos son producidos por una línea celular policlonal en un único biorreactor, la presencia de todos los miembros individuales de la composición de anticuerpo policlonal es generalmente evaluada subsecuente a la purificación, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico. La caracterización de una composición de un anticuerpo policlonal puede ser realizada por ejemplo como se describe en los documentos WO 2006/007853 y WO 2009/065414.

Composiciones terapéuticas

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende como un principio activo una composición de anticuerpo de la invención. Tales composiciones están destinadas a la mejora, prevención y/o tratamiento del cáncer. La composición farmacéutica puede ser administrada a un ser humano o a un animal doméstico o mascota, pero generalmente será administrada a humanos.

La proporción entre los anticuerpos individuales en una composición terapéutica de la invención o, en el caso de los anticuerpos individuales de la invención que son administrados de manera simultánea, secuencial o individual, frecuentemente será tal que los anticuerpos son administrados en las mismas cantidades, pero este no tiene que ser necesariamente el caso. De este modo, una composición de la invención que comprende dos anticuerpos anti-HER3 a menudo los contendrá en una proporción 1:1 y una composición que comprende tres anticuerpos anti-HER3 a menudo los contendrá en una proporción 1:1:1. Dependiendo de las características de los anticuerpos individuales, no obstante, puede ser deseable utilizar cantidades no iguales de los diferentes anticuerpos. Las proporciones adecuadas para los diferentes anticuerpos anti-HER3 en las composiciones de la invención pueden ser determinadas como se describe en el documento WO 2010/040356, el cual describe los métodos para identificar y seleccionar la proporción estequiométrica óptima entre las entidades químicas en un producto farmacológico combinatorio, por ejemplo, una composición de anticuerpo policlonal, para obtener un fármaco combinatorio con potencia y eficacia óptimas.

Además de la composición de anticuerpo de la invención, la composición farmacéutica comprenderá también al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de diluyentes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables son conservantes, estabilizadores, agentes tensioactivos/humectantes, agentes emulsionantes, solubilizadores, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Las soluciones o suspensiones pueden comprender además sustancias incrementadoras de la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa de sodio, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinilpirrolidona o gelatina. Un valor de pH adecuado para la composición farmacéutica estará en general en el intervalo de aproximadamente 5,5 a 8,5, tal como aproximadamente 6 a 8, por ejemplo aproximadamente 7, mantenido, cuando sea apropiado mediante el uso de un tampón.

Se puede emplear la práctica farmacéutica convencional para proporcionar las formulaciones o composiciones adecuadas para administrarse, por ejemplo, a pacientes con cáncer. La administración generalmente será terapéutica, lo que significa que se administra después de haberse diagnosticado un cáncer. Puede emplearse cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, parenteral, intravenosa, intra-arterial, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, con aerosol, supositorio o por vía oral. Las composiciones farmacéuticas de la invención serán administradas generalmente en la forma de soluciones o suspensiones líquidas, más generalmente soluciones o suspensiones acuosas, en particular soluciones o suspensiones acuosas isotónicas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preparadas de una manera conocida *per se*, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de disolución, liofilización, mezclado, granulación o confección. Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (ver, por ejemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21st edition), ed, A.R. Gennaro, 2005, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, ed. J. Swarbrick, 3rd edition, 2006, Informa Healthcare, Nueva York, NY, Estados Unidos).

Como una alternativa a una formulación líquida, las composiciones de la invención pueden ser preparadas en forma liofilizada que comprende al menos un anticuerpo solo o junto con un vehículo, por ejemplo manitol, en cuyo caso la composición es reconstituida con un líquido tal como agua estéril antes del uso.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender de aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 95 %, preferiblemente de aproximadamente 20 % a aproximadamente 90 % de principio activo. Las composiciones farmacéuticas pueden ser producidas, por ejemplo en forma de dosis unitaria, tal como en la forma de ampollas, viales, supositorios, comprimidos o cápsulas. Las formulaciones pueden ser administradas a individuos humanos en cantidades terapéuticas o profilácticamente efectivas (por ejemplo, cantidades que previenen, eliminan o reducen un estado patológico) para proporcionar terapia para un trastorno canceroso u otra afección. La dosis preferida del agente terapéutico que va a ser administrado, probablemente va a depender de variables tales como la severidad del cáncer, el estado general de salud del paciente particular, la formulación de los excipientes del compuesto, y su vía de administración.

15 *Usos terapéuticos de las composiciones de anticuerpos de acuerdo con la invención*

En una realización de la invención, la composición de anticuerpo es para su uso como un medicamento. En una realización preferida, la composición de anticuerpo es para su uso en el tratamiento del cáncer. En otra realización preferida, la composición de anticuerpo es para su uso en el tratamiento de un trastorno caracterizado por la dependencia de cualquiera de los miembros de la familia HER, en particular el cáncer.

En otra realización, la composición de anticuerpo de la invención es para su uso en el tratamiento del cáncer en un ser humano o en otro mamífero que ha adquirido resistencia al tratamiento con un anticuerpo anti-HER o TKI.

25 Teniendo en cuenta varios factores, los siguientes tipos de tumores en particular pueden estar indicados para el tratamiento con una composición de anticuerpo de la invención: cánceres de mama, ovario, gástrico, colon, recto, próstata, vejiga, páncreas, melanoma, cabeza y cuello y cáncer de pulmón no microcítico. Las composiciones de anticuerpo de la invención son contempladas para ser particularmente aplicables al tratamiento de cánceres que sobreexpresan EGFR o HER2, por ejemplo ciertos cánceres epiteliales tales como muchos cánceres de mama, cánceres de ovario y cánceres gástricos (estómago).

En relación con cada una de estas indicaciones, se contemplan dos vías clínicas principales, específicamente 1) la terapia adyuvante en conexión con al menos un tratamiento terapéutico adicional o 2) como una monoterapia. Estas dos opciones son brevemente discutidas a continuación.

35 1) Terapia adyuvante: en la terapia adyuvante, también conocida como terapia de combinación, los pacientes serán tratados con anticuerpos de la presente invención en combinación con al menos un tratamiento terapéutico adicional, generalmente un agente quimioterapéutico o antineoplásico y/o radioterapia. Alternativa o adicionalmente, la composición de la invención puede utilizarse también en combinación con un anticuerpo anticanceroso diferente, por ejemplo un anticuerpo que se dirige a VEGF. Las dianas del cáncer primario enumeradas anteriormente, pueden ser tratadas de este modo mediante la administración de un anticuerpo o la composición de la invención además de la terapia de primera línea y de segunda línea convencionales. Los diseños de protocolo se dirigirán a la efectividad como es evaluada, por ejemplo, por la reducción en la masa tumoral, así como la capacidad para reducir las dosis usuales de la quimioterapia estándar. Tales reducciones de la dosis pueden permitir una terapia adicional y/o prolongada mediante la reducción de la toxicidad relacionada con la dosis del agente quimioterapéutico.

Mediante la combinación de las composiciones de anticuerpo de la invención con los agentes que se sabe que inducen diferenciación terminal de las células cancerosas, el efecto puede ser mejorado adicionalmente. Tales compuestos pueden, por ejemplo, ser seleccionados del grupo que consiste en ácido retinoico, ácidos trans-retinoicos, ácidos cis-retinoicos, fenilbutirato, factor de crecimiento nervioso, sulfóxido de dimetilo, vitamina D3 en su forma activa, receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma, 13-acetato de 12- O-tetradecanoilforbol, hexametileno-bis-acetamida, factor de crecimiento transformante beta, ácido butírico, AMP cíclico y vesnarinona. Preferiblemente, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en ácido retinoico, fenilbutirato, ácido todo-trans-retinoico y forma activa de la vitamina D.

55 Los artículos farmacéuticos que comprenden una composición de anticuerpo de la invención y al menos un compuesto quimioterapéutico o antineoplásico, pueden utilizarse como un tratamiento en combinación para la administración simultánea, individual o sucesiva en carcinoterapia. El compuesto quimioterapéutico puede ser cualquier agente quimioterapéutico adecuado para el tratamiento del cáncer particular en cuestión, por ejemplo, un agente seleccionado del grupo que consiste en agentes alquilantes, por ejemplo, derivados de platino tales como cisplatino, carboplatino y/o oxaliplatino; alcaloides vegetales, por ejemplo paclitaxel, docetaxel y/o irinotecán; antibióticos antitumorales, por ejemplo doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, epirubicina, idarubicina mitoxantrona, dactinomicina, bleomicina, actinomicina, luteomicina y/o mitomicina; inhibidores de la topoisomerasa tales como topotecan y/o antimetabolitos, por ejemplo fluorouracilo y/u otras fluoropirimidinas.

65 Se contempla también que las composiciones de anticuerpo se puedan utilizar en la terapia adyuvante en conexión con los inhibidores de la tirosina quinasa (TKI). Estas son moléculas de bajo peso molecular, principalmente derivadas de quinazolina, sintéticas, que interactúan con el dominio de tirosina quinasa

intracelular de los receptores y que inhiben la fosforilación del receptor inducida por el ligando, por competencia por el sitio de unión al Mg-ATP intracelular. Varios inhibidores de la tirosina quinasa que bloquean la quinasa de HER2 están actualmente en fase de desarrollo clínico. Algunos de estos también se dirigen a EGFR o a otros receptores de la familia de EGFR. Para una revisión de estos TKI ver Spector et al. (2007) Breast Cancer Res. 9(2):2005. Los artículos farmacéuticos que comprenden una composición de anticuerpo de la invención y al menos un TKI que se dirige a HER2 también pueden utilizarse de este modo como un tratamiento de combinación para la administración simultánea, individual o sucesiva en carcinoterapia.

Las composiciones de anticuerpo pueden utilizarse en combinación con otros anticuerpos terapéuticos. Ejemplos de estos incluyen, por ejemplo anticuerpos contra EGFR (Erbix® o Vectibix®) o VEGF (Avastin®). Las composiciones de anticuerpo de la presente invención pueden ser utilizadas en combinación con un agente que se sabe que estimula las células del sistema inmunitario, conduciendo tal tratamiento de combinación a la mejora mediada por el sistema inmunitario de la eficiencia de las composiciones de anticuerpo de la invención. Ejemplos de tales agentes inmunoestimuladores incluyen las interleucinas recombinantes (por ejemplo, IL-21 e IL-2).

2) Monoterapia: En conexión con el uso de la composición de anticuerpo de acuerdo con la presente invención en la monoterapia de los tumores, la composición de anticuerpo puede ser administrada a pacientes sin el uso concurrente de un agente quimioterapéutico o antineoplásico, es decir como una terapia sola.

Inmunocombinados

Otra opción más para el uso terapéutico de las composiciones de la invención está en la forma de inmunocombinados, es decir anticuerpos conjugados con uno o más agentes anticancerosos. En particular en el caso de las composiciones de la invención que se unen a distintos epítopos, se contempla que ésta puede generar una red anticuerpo-receptor reticulada, sobre la superficie celular, dando como resultado potencialmente un nivel mayor de internalización del receptor en comparación con el uso de un solo anticuerpo monoclonal. La conjugación de uno o más de los anticuerpos individuales de tal composición a uno o más agentes anticancerosos por lo tanto tiene el potencial de distribuir específicamente y de manera efectiva los agentes anticancerosos conjugados al interior de las células tumorales, aumentando de esta manera el efecto de la composición de anticuerpo de la invención para proporcionar una actividad mejorada de destrucción de las células tumorales.

Diversos tipos de agentes anticancerosos pueden ser conjugados con los anticuerpos de la invención, incluyendo agentes citotóxicos (incluyendo agentes de quimioterapia convencionales y otros fármacos anticancerosos de molécula pequeña), citocinas (en cuyo caso el conjugado puede denominarse "inmunocitocina"), toxinas (en cuyo caso el conjugado puede ser denominado una "inmunotoxina") y radionúclidos, y unos pocos inmunocombinados han sido ya aprobados para el uso clínico. Estos incluyen Zevalin® (un anticuerpo murino anti-CD20 conjugado con ⁹⁰Y), Bexxar® (un anticuerpo murino anti-CD20 conjugado con ¹³¹I) y Mylotag® (un anticuerpo humanizado anti-CD33 conjugado con caliqueamicina). Otros inmunocombinados que han sido probados en ensayos clínicos incluyen anticuerpos conjugados por ejemplo con doxorubicina o un compuesto maitansinoide. Las inmunotoxinas que han sido probadas en ensayos clínicos incluyen varios anticuerpos conjugados con una exotoxina A truncada de *Pseudomonas*. También se ha ensayado una inmunocitocina que comprende un anticuerpo EpCAM inmunizado conjugado con IL-2.

En el caso de los anticuerpos de la invención conjugados con agentes citotóxicos, éstos pueden pertenecer por ejemplo a cualquiera de las principales clases de fármacos para quimioterapia, incluyendo agentes alquilantes (por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, capecitabina, gemcitabina), antraciclinas (por ejemplo, bleomicina, doxorubicina, mitoracina-C) y alcaloides vegetales (por ejemplo, taxanos tales como docetaxel y paclitaxel y alcaloides de la vinca tales como vinblastina, vincristina y vinorelbina). Ya que el uso de los inmunocombinados específicamente dirige al agente anticanceroso hacia los tumores y en particular al interior de las células tumorales después de la internalización, los inmunocombinados basados en los anticuerpos de la invención pueden estar basados ventajosamente en agentes altamente citotóxicos tales como la caliqueamicina y los derivados de maitansina o en toxinas tales como toxinas bacterianas (por ejemplo, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina de la difteria) o toxinas vegetales (por ejemplo, ricina).

El agente anticanceroso conjugado con un inmunocombinado está en general unido al anticuerpo por medio de un enlazador lábil que es relativamente estable en suero pero que permite la liberación del agente cuando el inmunocombinado es internalizado dentro de la célula diana. Los enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores químicos que son estables a pH neutro en suero pero que están sometidos a hidrólisis ácida en las condiciones levemente ácidas dentro de los lisosomas después de la internalización, los enlazadores disulfuro que son escindidos por los tioles intracelulares y los enlazadores peptídicos que son estables en suero pero que son sometidos a escisión enzimática en los compartimientos intracelulares.

Se pueden contemplar diversas disposiciones en las composiciones que contienen dos o más anticuerpos de la invención. Por ejemplo, con dos anticuerpos sería posible conjugar los anticuerpos a dos o más fármacos anticancerosos diferentes o conjugar un anticuerpo con un profármaco que es activado por un agente tal como una enzima conjugada con el otro anticuerpo. El concepto general de, terapia de profármaco enzimático dirigida al anticuerpo (ADEPT) ha sido descrito para los anticuerpos monoclonales, donde un profármaco es activado por una enzima dirigida al tumor por un conjugado mAB-enzima, pero la presente invención puede proporcionar una

oportunidad para diseñar a la medida este procedimiento para las condiciones particulares. De este modo, puede ser posible incrementar específicamente la destrucción de las células tumorales ahorrando o reduciendo el daño a los tejidos normales.

- 5 Para información adicional sobre los inmunocombinados anti-cáncer, ver Wu et al. (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146; Schrama et al. (2006) Nature Reviews/Drug Discovery 5:147-159 y Rohrer (2009) chimica oggi/Chemistry Today 27 (5):56-60.

Dosis y vía de Administración

10 Los anticuerpos y las composiciones de la invención serán administrados en una cantidad efectiva para el tratamiento de la afección en cuestión, por ejemplo, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios para lograr un resultado deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar de acuerdo con factores tales como la afección particular que se trate, la edad, el sexo y el peso del paciente y si los anticuerpos anti-HER3 están siendo administrados como un tratamiento único o en combinación con uno o más de otros tratamientos anticancerosos adicionales.

15 Una cantidad efectiva para la terapia tumoral puede ser medida por su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad y/o mejorar los síntomas en un paciente y preferiblemente para revertir la progresión de la enfermedad, por ejemplo, reduciendo el tamaño del tumor. La capacidad de un anticuerpo o composición de la invención para inhibir el cáncer puede ser evaluada mediante ensayos *in vitro*, por ejemplo, como se describe en los ejemplos, así como en modelos animales adecuados que son predictivos de la eficacia en tumores humanos. Las pautas posológicas adecuadas serán seleccionadas con el fin de proporcionar una respuesta terapéutica óptima en cada situación particular, por ejemplo, administrados como un bolo simple o como una infusión continua, y con el posible ajuste de la dosis como está indicado por las exigencias de cada caso.

20 Aunque la dosificación específica para los anticuerpos de acuerdo con la invención no ha sido todavía determinada, se pueden determinar ciertas consideraciones posológicas mediante la comparación con un producto similar (por ejemplo un anticuerpo monoclonal dirigido contra HER2 o EGFR) que ha sido probado para el uso terapéutico. De este modo, se contempla que una dosis apropiada de una composición de anticuerpo de la invención será similar a la dosis recomendada para el anticuerpo monoclonal anti-HER2 trastuzumab (Herceptin®) o el anticuerpo monoclonal anti-EGFR panitumumab (Vectibix®). Dependiendo de la afección particular, Herceptin® es administrado (por medio de infusión) para el tratamiento del cáncer de mama a una dosis inicial de 4 mg/kg y dosis semanales posteriores de 2 mg/kg, o una dosis inicial de 8 mg/kg, y dosis subsecuentes de 6 mg/kg cada tres semanas, mientras que Vectibix® es administrado a una dosis de 6 mg/kg cada 14 días. Se contempla que una dosis adecuada de una composición de anticuerpo de la invención puede estar en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,5 a 50 mg/kg por ejemplo aproximadamente de 1 a 20 mg/kg. La composición de anticuerpo puede por ejemplo ser administrada en una dosis de al menos 0,25 mg/kg, por ejemplo al menos 0,5 mg/kg, tal como al menos 1 mg/kg, por ejemplo al menos 1,5 mg/kg, tal como al menos 2 mg/kg, por ejemplo, al menos 3 mg/kg, tal como al menos 4 mg/kg, por ejemplo, tal como al menos 5 mg/kg y por ejemplo como hasta lo sumo 50 mg/kg, tal como hasta lo sumo 30 mg/kg, por ejemplo hasta lo sumo 20 mg/kg, tal como hasta lo sumo 15 mg/kg. La administración normalmente se repetirá a intervalos adecuados, por ejemplo una vez cada semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas y durante tanto tiempo como sea considerado apropiado por el doctor responsable, el cual puede opcionalmente incrementar o disminuir la dosis como sea necesario.

45 Se contemplan tres procedimientos de administración distintos para la administración de los anticuerpos de la invención. La administración intravenosa convencional presumiblemente será la técnica de distribución estándar para la mayoría de los tumores. Sin embargo, en conexión con los tumores en la cavidad peritoneal, tales como los tumores de los ovarios, el conducto biliar, otros conductos y similares, la administración intraperitoneal puede probar ser favorable para la obtención de una alta dosis de anticuerpo en el tumor y para reducir al mínimo el aclaramiento del anticuerpo. Similarmente, ciertos tumores sólidos poseen vasculatura que es apropiada para la perfusión regional. La perfusión regional puede permitir la obtención de una alta dosis del anticuerpo en el sitio de un tumor y reducir al mínimo el aclaramiento a corto plazo del anticuerpo.

50 Como con cualquier producto terapéutico basado en la infusión de una proteína o anticuerpo, los problemas de seguridad están relacionados principalmente con (i) el síndrome de liberación de citocina, es decir, hipotensión, fiebre, estremecimiento, escalofríos, (ii) el desarrollo de una respuesta inmunogénica a la proteína (es decir el desarrollo de anticuerpos humanos por el paciente al producto de anticuerpo recombinante), (iii) la toxicidad para las células normales que expresan los receptores de la familia HER, por ejemplo, muchas células epiteliales. Para el control de cualquiera de estos problemas de seguridad se utilizan las pruebas y los procedimientos de seguimiento convencionales.

55 La invención será además descrita en los siguientes ejemplos no limitantes.

60

65

Ejemplos

Los anticuerpos que se dirigen a EGFR y a HER2 utilizados en los siguientes ejemplos han sido todos identificados de acuerdo con los métodos descritos en los documentos WO 2008/104183 A2 y WO 2011/107957 A1. El anticuerpo monoclonal utilizado como el mAb control en los ejemplos es Synagis (palivizumab). En todos los Ejemplos, la concentración sobre el eje x es la concentración del anticuerpo total, es decir, en las mezclas de dos anticuerpos, cada anticuerpo individual comprende la mitad del total; en las mezclas de tres anticuerpos, cada anticuerpo individual comprende un tercio del total, etc.

10 Ejemplo 1: Clonación de los anticuerpos anti-HER3

Inmunización

15 Para las inmunizaciones se utilizaron tres ratones hembra, un ratón BALB/cJ, un ratón C57BL/6 y un ratón C3H (de 8 a 10 semanas de edad). Los ratones fueron inmunizados con la proteína HER3 comercialmente disponible (R&D Systems, N.º cat. 348-RB). Para las primeras cuatro inmunizaciones, la proteína HER3 fue diluida en PBS y mezclada 1:1 (v/v) con adyuvante de Freund. La quinta inmunización final fue administrada sin adyuvante con la proteína HER3 en PBS.

20 El adyuvante es utilizado para aumentar y modular la respuesta inmunitaria. En la primera inmunización se utilizó el adyuvante completo de Freund (CFA), mientras que para la segunda, tercera y cuarta inmunizaciones se utilizó adyuvante incompleto de Freund (IFA). IFA es una emulsión aceite en agua compuesta de aceites minerales y CFA es IFA que contiene especies de *Mycobacterium* deshidratadas, destruidas por calor. Ambos adyuvantes tienen un efecto de depósito. El *Mycobacterium* en CFA da como resultado una fuerte activación del sistema inmunitario, lo que conduce a la persistencia a largo plazo de la respuesta inmunitaria. Únicamente fueron administradas a los ratones emulsiones estables.

30 Se utilizaron 10 µg de proteína HER3 recombinante para cada inmunización. En total, los ratones recibieron cinco inyecciones. Todos los ratones fueron inyectados subcutáneamente (s.c.) con 200 µl de emulsión antígeno-adyuvante para las primeras cuatro inyecciones, e intraperitonealmente (i.p.) con 100 µl de antígeno en PBS para la quinta inyección, un resumen de las inmunizaciones, los adyuvantes, las rutas de inyección etc., se encuentra en la Tabla 4.

35 Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se recolectaron los bazo y los nódulos linfáticos inguinales. Las suspensiones celulares simples fueron preparadas mediante maceración a través de un tamiz celular de 70 µm (Falcon, BD Biosciences, N.º Cat. 352350). Las células de los tres ratones fueron combinadas, resuspendidas en RPMI-1640 frío con FBS 10 % y centrifugadas.

40 *Tabla 4: Resumen de la inmunización*

Día	Inmunización	Adyuvante	Antígeno Ng/dosis	Conc. de antígeno µg/ml	Volumen de dosis	Vía de administración
0	1ª	CFA	10	50	200 µl	s.c.
21	2ª	IFA	10	50	200 µl	s.c.
42	3ª	IFA	10	50	200 µl	s.c.
69	4ª	IFA	10	50	200 µl	s.c.
86	5ª	PBS	10	100	100 µl	i.p.
89	Recolección del órgano	-	-	-	-	-

Clasificación por FACS de células plasmáticas murinas

45 Para retirar los glóbulos rojos, la suspensión celular combinada fue lisada en NH₄Cl 0,7 M. Después de la lisis las células fueron lavadas dos veces en FBS 2%/PBS. Las células fueron resuspendidas en 1 ml de FBS 2 %/PBS, incubadas con Fc-block (anti-CD16/CD32 de ratón, BD Biosciences, N.º Cat. 553141) y lavadas una vez. Después de re-suspensión en FBS 2%/PBS, las células fueron teñidas con anti-CD43 de ratón-FITC (BD Biosciences, N.º Cat. 553270), anti-CD138 de ratón-PE (BD Biosciences, N.º Cat. 553714), anti-IgM de ratón-Horizon (BD Biosciences, N.º Cat. 560575), anti-IgG1 de ratón-APC (BD Biosciences, N.º Cat. 550874), anti-MHC II (I-A/I-Ed) de ratón-biotina (BD Biosciences, N.º Cat. 553622) y anti-B220/CD45R de ratón-PerCP (BD Biosciences, N.º Cat. 553093) durante 20 minutos en la oscuridad. Las células fueron cosechadas, incubadas con estreptavidina-APC-Cy7 (BD Biosciences, N.º Cat. 554063) durante 20 minutos y lavadas. Las células fueron clasificadas por FACS en un clasificador de células FACSAria. Las células que fueron B220^{br/>bajo}MHCII^{br/>bajo}CD43^{br/>bajo}CD138^{br/>bajo}IgM^{br/>bajo} fueron clasificadas como células individuales en placas de microtitulación de 384 pocillos que contenían el tampón de reacción de PCR. Las placas fueron centrifugadas, congeladas y almacenadas a -80 °C.

Unión de los pares V_H y V_L análogos

La unión de las secuencias de codificación de V_H y V_L fue realizada en las células individuales conocidas como células plasmáticas, facilitando el apareamiento análogo de las secuencias de codificación de V_H y V_L. El procedimiento utilizó un procedimiento de PCR de dos etapas basado en una RT-PCR de solapamiento-extensión múltiple de una sola etapa, seguido por una PCR anidada. Las mezclas cebadoras utilizadas en el primer ejemplo únicamente amplifican las cadenas ligeras kappa. Sin embargo, si se desea, se pueden añadir cebadores capaces de amplificar las cadenas ligeras lambda a la mezcla cebadora múltiple y a la mezcla cebadora de PCR anidada. Si se añaden cebadores lambda, el procedimiento de clasificación debe ser adaptado de tal forma que las células lambda positivas no son excluidas. El principio para la unión de las secuencias V_H y V_L análogas se describe con detalle en el documento WO 2005/042774 y en Meijer et al. (2006) J Mol Biol. 358(3):764-72.

Las placas de PCR de 96 pocillos fueron descongeladas y las células clasificadas sirvieron como molde para la RT-PCR de solapamiento-extensión múltiple. El tampón de clasificación agregado a cada pocillo antes de la clasificación de células individuales, contenía tampón de reacción (tampón OneStep RT-PCR; Qiagen), los cebadores para RT-PCR y el inhibidor de ARNasa (RNasin, Promega). Los cebadores utilizados para la RT-PCR de solapamiento-extensión así como las concentraciones de cebador fueron las mismas que las mostradas en la Tabla 3 del documento WO 2008/104183. Esto fue suplementado con la mezcla OneStep RT-PCR5Enzyme (dilución 25xM Qiagen) y la mezcla de dNTP (200 µM cada una) para obtener la concentración final dada en un volumen de reacción de 20 µl. Las placas fueron incubadas durante 30 minutos a 55 °C para permitir la transcripción inversa (RT) del ARN de cada célula. Después de la RT, las placas fueron sometidas al siguiente ciclo de PCR: 10 minutos a 94 °C, 35x (40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 60 °C, 5 minutos a 72 °C), 10 minutos a 72 °C.

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un Ciclador Térmico H20BIT con una Canasta de Sello Desprendible para 24 placas de 96 pocillos (ABgene) para facilitar un alto rendimiento. Las placas de PCR fueron almacenadas a -20 °C después del ciclo.

Para la etapa de PCR anidada, se prepararon placas de PCR de 96 pocillos con la siguiente mezcla en cada pocillo (reacciones de 20 µl) para obtener la concentración final dada: tampón 1 x FastStart (Roche), mezcla de dNTP (200 µM cada uno), mezcla del cebador anidado, ADN-polimerasa Phusion (0,08 U; Finnzymes) y la mezcla de Enzimas de Alta Fidelidad FastStart (0,8 U; Roche). Los cebadores utilizados para la PCR anidada así como las concentraciones del cebador fueron las mismas que las mostradas en la Tabla 4 del Documento WO 2008/104183. Como molde para la PCR anidada, se transfirió 1 µl de las reacciones de PCR de solapamiento-extensión múltiples. Las placas de PCR anidadas fueron sometidas al siguiente ciclo térmico: 35x (30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 90 segundos a 72 °C), 10 minutos a 72 °C. Las reacciones aleatoriamente seleccionadas fueron analizadas sobre un gel de agarosa al 1 % para verificar la presencia de un fragmento de solapamiento-extensión de aproximadamente 890 pares de bases (pb). Las placas fueron almacenadas a -20 °C hasta el procesamiento posterior de los fragmentos de PCR.

Los reportorios de los pares de codificación de V_H y V_L unidos provenientes de la PCR anidada, fueron combinados, sin mezclar pares de diferentes donantes, y fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, preparativa. La secuencia de codificación de la cadena ligera constante kappa humana fue empalmada mediante extensión- solapamiento a la región de codificación de V_L de los productos de PCR combinados de los pares de codificación V_H y V_L unidos, como se describe en el documento WO 2008/104183. La secuencia de codificación de la cadena ligera constante kappa humana fue amplificada a partir de un plásmido que contenía una secuencia de codificación de un anticuerpo humano con una cadena ligera kappa en una reacción que contenía: la Enzima Phusion (2 U; Finnzymes), el tampón 1x Phusion, la mezcla de dNTP (200 µM cada uno), el cebador hKCforw-v2 y el cebador kappa3' (ver en la Tabla 5 del documento WO 2008/104183 los cebadores y las concentraciones empleadas) y el molde de plásmido pLL138 (10 ng/µl) en un volumen total de 50 µl. La reacción fue sometida al siguiente ciclo térmico: 25x (30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, 45 segundos a 72 °C), 10 minutos a 72 °C. El fragmento de PCR resultante fue purificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, preparativa.

Los fragmentos de PCR, combinados, purificados provenientes de cada reportorio fueron empalmados al fragmento de PCR amplificado y purificado de la región de codificación de la región constante kappa humana (SEQ ID NO: 41) mediante empalme por PCR de solapamiento-extensión (50 µl de volumen total) que contenía: el fragmento de la región de codificación constante kappa humana (1,4 n/µl), el fragmento de PCR combinado, purificado (1,4 ng/µl), la ADN-polimerasa Phusion (0,5 U; Finnzymes) y la Mezcla Enzimática de Alta Fidelidad FastStart (0,2 U; Roche), tampón 1x FastStart (Roche), mezcla de dNTP (200 µM cada uno), el cebador mhKCreV y los cebadores del grupo mJH (ver Tabla 5 del documento WO 2008/104183 para los cebadores y las concentraciones empleadas). La reacción fue sometida al ciclo térmico siguiente: 2 minutos a 95 °C, 25x (30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, 1 minuto a 72 °C), 10 min a 72 °C. El fragmento de PCR resultante (aproximadamente 4518 pb) fue purificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % preparativa.

Inserción de los pares de codificación V_H y V_L análogos dentro de un vector de selección

Con el fin de identificar los anticuerpos con especificidad de unión a HER3, las secuencias de codificación de V_H y V_L obtenidas fueron expresadas como anticuerpos de longitud completa. Esto implicó la inserción del repertorio de los pares de codificación de V_H y V_L dentro de un vector de expresión y la transfección dentro de una célula hospedadora.

Se utilizó un procedimiento de clonación de dos etapas para la generación de un repertorio de vectores de expresión que contenían los pares de codificación de V_H y V_L unidos. Estadísticamente, si el repertorio de vectores de expresión contiene diez veces tantos plásmidos recombinantes como el número de productos de PCR de V_H y V_L apareados, análogos, utilizados para la generación del repertorio de selección, existe una probabilidad de 99 % de que todos los pares de genes únicos estén representados. De este modo, si se obtenían 400 fragmentos del gen V del solapamiento-extensión, se generaría un repertorio de al menos 4000 clones para que la selección tenga una probabilidad del 99 % de obtener todos los pares de genes únicos.

En resumen, los productos de PCR purificados de los repertorios de los pares de codificación de V_H y V_L unidos, empalmados a la región de codificación constante kappa humana, fueron escindidos con las endonucleasas de ADN *XhoI* y *NotI* en los sitios de reconocimiento introducidos dentro de los extremos de los productos de PCR. Los fragmentos escindidos y purificados fueron ligados dentro de un vector de expresión de IgG de mamífero, digerido con *XhoI/NotI*, OO-VP-002 (descrito en el documento WO 2008/104183), mediante procedimientos convencionales de ligamiento. La mezcla de ligamiento se sometió a electroforesis dentro de *E. coli* y añadida a las placas 2xYT que contenían el antibiótico apropiado y se incubaron a 37 °C toda la noche. El repertorio amplificado de los vectores fue purificado a partir de las células recuperadas de las placas utilizando los métodos de purificación de ADN convencionales (Qiagen). Los plásmidos fueron preparados para la inserción de los fragmentos guía de promotor mediante escisión utilizando las endonucleasas *Ascl* y *NheI*. Los sitios de restricción para estas enzimas estaban localizados entre los pares de genes de codificación de V_H y V_L. Después de la purificación del vector, se insertó un fragmento promotor-guía de mamífero, bidireccional, digerido con *Ascl* y *NheI* dentro de los sitios de restricción de *Ascl* y *NheI* mediante procedimientos de ligamiento convencionales. El vector ligado se amplificó en *E. coli* y el plásmido se purificó utilizando métodos convencionales. El repertorio generado de los vectores de selección se transformó en *E. coli* mediante procedimientos convencionales. Las colonias obtenidas se consolidaron en placas maestras de 384 pocillos y se almacenaron.

Para la amplificación de los plásmidos de expresión de mamífero se empleó un procedimiento de dos etapas. En primer lugar, las bacterias se sometieron a lisis y el ADN se desnaturalizó mediante incubación en hidróxido de sodio. Posteriormente, se realizó la amplificación TempliPhi (GE Amersham). Este método utiliza la ADN-polimerasa del bacteriófago Φ29 para amplificar exponencialmente las plantillas de ADN circulares de doble hebra, mediante amplificación de círculo rodante. Para la expresión del anticuerpo en células de mamífero, fue aplicado el sistema de expresión 293Freestyle™ (Invitrogen) utilizando las condiciones de transfección convencionales como son recomendadas por el fabricante. Las células fueron suplementadas con valproato a 50 mM antes de la transfección y al siguiente día se añadió Tryptone N1 hasta una concentración final de 1,5 % (p/v) del volumen de transfección. Los sobrenadantes que contenían los anticuerpos fueron cosechados seis días después de la transfección. Los niveles de expresión fueron estimados con ELISA anti-IgG estándar.

Selección para el enlace a la proteína HER3 recombinante (ELISA)

La especificidad del anticuerpo fue determinada mediante ELISA utilizando la proteína HER3-recombinante como antígeno.

En resumen, las placas Nunc Maxisorb (N.º Cat. 464718) fueron recubiertas con 1 µg/ml de proteína HER3 (R&D Systems N.º Cat. 348-RB), diluidas en PBS a 4° C toda la noche. Antes del bloqueo en 50 µl de leche 2 %- PBS + Tween 20 0,05, las placas fueron lavadas una vez con PBS-T. Las placas fueron lavadas una vez con PBS-T y 20 µl de leche 2 %- PBS-T y se añadieron 10 µl de los sobrenadantes de los transfectantes FreeStyle293 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual las placas fueron lavadas una vez con PBS-T, 20 µl por pocillo. El anticuerpo Secundario (HRP-anti-cadena ligera kappa humana de cabra, Serotec, N.º Cat. STAR 100P) diluido 1:25000 en leche 2 %-PBS-T fue añadido para detectar los anticuerpos unidos a los pocillos y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron una vez en PBS-T antes de la adición de 25 µl del sustrato (Kem-En-Tec Diagnostics, N.º Cat. 4518) que se incubó durante 5 minutos. Se añadieron 25 µl de ácido sulfúrico 1M después de la incubación para detener la reacción. La señal específica fue detectada en un lector de ELISA a 450 nm. A partir de los datos de ELISA fueron identificados 480 clones de anticuerpos positivos y seleccionados para el análisis de la secuencia y la validación de la unión a HER3.

Análisis de secuencia y selección de clones

Los clones identificados como unidos a HER3 por ELISA, fueron recuperados de las placas maestras originales (formato de 384 pocillos) y rayados sobre placas de agar para generar colonias individuales, las cuales fueron después picadas en cultivos de medio LB e incubadas a 37 °C toda la noche con agitación vigorosa. El ADN del

plásmido fue aislado de los clones utilizando el kit Qiaprep 96 turbo miniprep (Quiagen, N.º Cat. 27193) y sometido a la secuenciación de ADN de los genes V. Las secuencias fueron alineadas y se seleccionaron los clones individuales. Múltiples alineaciones de las secuencias obtenidas revelaron el carácter único de cada clon particular y permitieron la identificación de los anticuerpos únicos. Después del análisis de la secuencia de los clones secuenciados, fueron identificados 33 grupos de secuencia relacionadas con dos a más de cuarenta miembros así como más de 20 clonotipos que estaban representados una vez. Cada grupo de secuencias relacionadas ha sido probablemente derivada a través de hipermutaciones somáticas de un clon precursor común. En general, se eligieron uno a dos clones provenientes de cada grupo para la validación de la secuencia y la especificidad. Basándose en el análisis grupal, se seleccionaron 119 clones para la expresión a pequeña escala y la caracterización posterior. Las secuencias de las regiones variables de anticuerpo seleccionadas son mostradas en el listado de secuencias anexo. Las secuencias de la cadena ligera mostradas en el listado de secuencias incluyen todas las mismas regiones constantes kappa humanas, que comienza con los aminoácidos -TVAAP- y termina en el -NRGEC C-terminal. Con el fin de validar los clones que codifican para el anticuerpo, se preparó el plásmido de ADN y se realizó la transfección de las células CHO-S FreeStyle (Invitrogen) a escala de 2 ml para la expresión. Los sobrenadantes fueron cosechados 6 días después de la transfección. Los niveles de expresión fueron estimados con ELISA estándar de anti-IgG y la especificidad fue determinada por ELISA específico de HER3, como se describe anteriormente en "Selección para la unión a la proteína HER3 recombinante" y mediante microscopía confocal de selección de alto rendimiento de la unión del anticuerpo a las células que sobreexpresan HER3 (ver más adelante).

20 *Selección para la unión a las células que sobreexpresan HER3 (OPERA)*

Los 119 clones fueron seleccionados para el enlace a la línea de células cancerosas de mama que sobreexpresan HER3 (MCF-7) utilizando microscopía confocal. 10.000 células MCF-7 fueron sembradas dentro de cada pocillo de las placas portadoras de células de 384 pocillos (Perkin Elmer, N.º Cat. 6007439) y se dejaron unir toda la noche. Los medios fueron nuevamente desechados y las células fueron lavadas y fijadas con una solución de formaldehído al 2 % (Aldrich N.º Cat. 533998). Después del lavado, se transfirieron 40 µl del sobrenadante de anticuerpo a cada pocillo y las placas fueron incubadas durante 2 horas, después de lo cual el medio de los pocillos fue desechado y se añadieron 30 µl del nuevo medio que contenía 2 µg/ml de la IgG anti-humana, de cabra, marcada con Alexa-488 (H+L, Invitrogen N.º Cat. A11013), 2 µg/ml de azul CellMask (Invitrogen N.º Cat. H34558) y se añadió a cada pocillo Hoechst 33342 1 µM (Invitrogen N.º Cat. H3570) y las placas se incubaron durante otros 30 minutos. El nivel de fluorescencia se midió a continuación utilizando un microscopio confocal de alto rendimiento OPERA (Perkin Elmer).

A partir de los datos de unión obtenidos mediante las selecciones de validación de ELISA y OPERA, se seleccionaron 64 clones para la expresión a escala media.

Ejemplo 2: Selección de una mezcla de anticuerpo óptima contra EGFR, HER2 y HER3 respectivamente

Este ejemplo demuestra que las mezclas de anticuerpos contra cada receptor de la familia HER individual (EGFR, HER2 y HER3) son superiores a los anticuerpos individuales.

Métodos

Se seleccionaron para este estudio tres anticuerpos monoclonales contra cada receptor (Tabla 5). Los anticuerpos contra cada receptor se unen a los epítomos no solapantes como es confirmado por los análisis de Resonancia de Plasmón Superficial

Tabla 5: Anticuerpos utilizados en el estudio

Diana	Anticuerpo
EGFR	IgG1 quimérica 992
EGFR	IgG1 quimérica 1024
EGFR	IgG1 quimérica 1030
HER2	IgG1 quimérica 4382
HER2	IgG1 quimérica 4385
HER2	IgG1 quimérica 4518
HER3	IgG1 quimérica 4785
HER3	IgG1 quimérica 5082
HER3	IgG1 quimérica 5096

Los anticuerpos seleccionados y las mezclas de anticuerpos fueron probados para determinar la capacidad de inhibir el crecimiento y la proliferación de las líneas de células cancerosas A431NS (EGFR), NC1-N87 (HER2) y MCF-7 estimuladas con la herregulina beta 10 nM (HER3) utilizando un ensayo de viabilidad. El daño celular inevitablemente dará como resultado la pérdida de la capacidad de la célula para mantener y proporcionar energía

para la función celular metabólica y el crecimiento. Los ensayos de actividad metabólica están basados en esta premisa y habitualmente miden la actividad mitocondrial. El Reactivo de Proliferación Celular WST-1 (Roche N.º Cat. 11 644 807 001) es un sustrato listo para utilizar que mide la actividad metabólica de las células viables. Se asume que la actividad metabólica se correlaciona con el número de células viables. En este ejemplo, se utilizó el ensayo WST-1 para medir el número de células metabólicamente activas después del tratamiento de las células cancerosas con diferentes concentraciones de anticuerpos durante 96 horas.

Antes de realizar el ensayo WST-1 los anticuerpos apropiados y las mezclas de anticuerpos fueron diluidos hasta una concentración final de anticuerpo total de 100 µg/ml en medios apropiados suplementados con 2 % de FBS y 1 % de P/S produciendo una concentración final de anticuerpo total de 50 µg/ml en el pocillo que contenía la concentración más alta de anticuerpo. A continuación se hizo una dilución serial de tres veces de los anticuerpos. A continuación se añadieron los números relevantes de células a los pocillos experimentales de una placa de 384 pocillos. Las placas fueron incubadas durante 4 días en una incubadora humidificada a 37 °C. El reactivo WST-1 fue después agregado a las placas y las placas fueron incubadas durante una hora a 37 °C. Las placas fueron transferidas a un agitador de placa orbital durante una hora y se midió la absorbancia a 450 y 620 nm (longitud de onda de referencia) utilizando un lector de ELISA. La cantidad de células metabólicamente activas (CMA) se calcula como un porcentaje del control no tratado, como sigue:

$$\% CMA = \left(\frac{(DO_{exp.} - DO_{medios})}{(DO_{sin\ trat.} - DO_{medios})} \right) \times 100$$

Resultados

Los resultados de las titulaciones de los tres anticuerpos anti-EGFR y todas las posibles mezclas de estos en la línea celular A431NS se muestran en la Figura 1A. Es evidente que las mezclas de anticuerpo son superiores a los anticuerpos individuales. La mezcla de anticuerpo que consiste en 992 y 1024 fue seleccionada ya que ésta tuvo la eficacia y potencia más altas. Los resultados de las titulaciones de los tres anticuerpos anti-HER2 y todas las posibles mezclas de estos en la línea celular NCI-N87 se muestran en la Figura 1B. Nuevamente, las mezclas de anticuerpos fueron superiores a los anticuerpos individuales. La mezcla de anticuerpo que consiste en 4282, 4385 y 4518 fue seleccionada ya que ésta tuvo la eficacia y potencia más altas. Los resultados de las titulaciones de los tres anticuerpos anti-HER3 y todas las posibles mezclas de estos en la línea celular MCF7 estimulada con herregulina beta 10 nM, se muestran en la Figura 1C. Fue difícil discriminar entre el mejor anticuerpo monoclonal 5082 y la mejor mezcla de anticuerpo 4785+5082. Sin embargo, existía una ligera tendencia de que la mezcla fuera mejor y por lo tanto ésta fue seleccionada para la prueba de las mezclas pan-HER.

Ejemplo 3: Actividad inhibitoria del cáncer de las mezclas de anticuerpos pan-HER

Este ejemplo demuestra que la selección como diana óptima de más de uno de los receptores de la familia HER, se obtiene combinando las mezclas de anticuerpos contra cada receptor y que la selección como diana de tres receptores es superior a la selección como diana de dos receptores.

Métodos

Las mezclas optimizadas contra los tres receptores 992+1024 (EGFR), 4382+4383+4518 (HER) y 4785+5082 (HER3), así como todas las posibles mezclas de estos fueron probadas para determinar la capacidad de inhibir el crecimiento y la proliferación de la línea de células cancerosas A431NS (EGFR), NCI-N87 (HER2) y MCF-7 estimulada con herregulina beta 10 nM (HER3) utilizando un ensayo de viabilidad similar al descrito en el Ejemplo 2.

Resultados

Los resultados de las titulaciones de las tres mezclas de anticuerpos y todas las posibles mezclas de estos sobre las líneas celulares A431NS, MCF7 y NCI-N87 se muestran en las Figuras 2, 3 y 4 respectivamente. En las combinaciones de células A431NS las combinaciones de las mezclas de EGFR y mezclas de HER3 o HER2 dieron origen a incrementos sinérgicos en la inhibición del crecimiento de las células cancerosas (Figura 2). Una combinación de mezclas contra HER2 y HER3 no tuvo efecto inhibitorio sobre las células A431NS. Sin embargo, una combinación de mezclas contra los tres receptores fue superior a las mezclas individuales y a las combinaciones de mezclas contra dos receptores.

Se encontraron resultados similares en la línea celular MCF7 (Figura 3). Las combinaciones de mezclas de EGFR y mezclas de HER3 o HER2 o mezclas de HER2 y HER3 dieron origen a incrementos sinérgicos en la inhibición del crecimiento de las células cancerosas. La combinación de mezclas contra los tres receptores fue superior a las mezclas individuales y a las combinaciones de mezclas contra dos receptores.

En la línea celular NC-N87 no se obtuvieron incrementos en la potencia o en la eficacia por la combinación de la mezcla anti-HER2 eficiente con una mezcla de anti-EGFR o con una mezcla de anti-HER3 (Figura 4). Una combinación de mezclas contra EGFR y HER3 no tuvo efecto inhibitorio sobre las células NCI-N87. La combinación de las mezclas contra los tres receptores tuvo potencia y eficacia similares a la mezcla de anti-HER2.

La combinación de mezclas contra los tres receptores fue comparada con la de los anticuerpos monoclonales comercializados cetuximab (EGFR) y trastuzumab (HER2) y una mezcla de estos dos anticuerpos (Figura 5) . Los resultados demuestran que la mezcla pan-HER es superior a cetuximab y trastuzumab y también a una mezcla de estos dos anticuerpos en las tres líneas celulares. En general, los resultados en este ejemplo demuestran que la selección como diana óptima de más de uno de los receptores de la familia HER se obtiene combinando mezclas de anticuerpos contra cada receptor y que la selección como diana óptima de tres receptores es superior a la selección como diana óptima de dos receptores.

Ejemplo 4: Perfil inhibitorio mediante la selección como diana de los dos receptores de la familia HER, EGFR y HER2 simultáneamente con una combinación de mezclas de anticuerpos

Este ejemplo demuestra que la combinación de la mezcla anti-EGFR y la mezcla HER2 inhibe las líneas celulares cancerosas MCF7, HCC202, BT474, NCI-N87, MDA-NB-175, A431NS, HN5, H292, DU145 y MDA-MB-468.

Métodos

La mezcla anti-EGFR (992+1024), la mezcla anti-HER2 (4382+4385+4815) y la combinación de estas dos mezclas fueron analizadas para determinar la capacidad de inhibir el crecimiento de diez líneas celulares cancerosas humanas con dependencia de EGFR o HER2. Los anticuerpos monoclonales comercializados cetuximab y trastuzumab fueron incluidos como controles.

Las líneas de células cancerosas MCF7, HCC202, BT474, NCI-N87, MDA-MB-175, A431NS, HN5, H292, DU145 y MDA-MB-468 fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una concentración de 1000 células/pocillo en medios que contenían 2 µg/ml del anticuerpo anti-HER2. Las placas fueron incubadas durante 4 días en una incubadora humidificada a 37 °C. Después se añadieron 20 µl del reactivo WST-1 por pocillo y las placas se incubaron durante una hora a 37 °C. Las placas fueron luego transferidas a un agitador de placa orbital y se dejaron durante otra hora más. La absorbancia fue medida a 450 y 620 nm (longitud de onda de referencia) en un lector de ELISA. Los niveles de inhibición del crecimiento fueron calculados como el porcentaje de las células control no tratadas.

Resultados

Los resultados de la investigación de la inhibición del crecimiento celular se presentan en la Figura 6 y muestran que la combinación de la mezcla de anti-EGFR y la mezcla de HER2 inhibe todas las líneas celulares probadas. La selección como diana de solo uno de los receptores da como resultado la inhibición de las líneas celulares que son dependientes de ese receptor. En general, estos resultados muestran que una combinación de mezclas de anticuerpos contra EGFR y HER2 da un perfil inhibitorio mucho más amplio, pudiendo ser en último término utilizado para tratar pacientes cuyos tumores son dependientes de cualquiera de los receptores.

Ejemplo 5: Degradación de EGFR, HER2 y HER3 con una combinación de mezclas de anticuerpos

Este ejemplo demuestra que las mezclas de anticuerpos inducen la degradación de su diana (EGFR, HER2 o HER3) y que las combinaciones de mezclas contra las tres dianas pueden inducir la degradación de todos los receptores simultáneamente.

Métodos

Con el fin de investigar el nivel de degradación de EGFR, HER2 y HER3 inducida por las mezclas de anticuerpos y combinaciones de mezclas, se realizaron análisis de transferencia Western en lisados de células completas de las células HN5, N87 y MCF7 tratadas con el anticuerpo durante 48 horas. Las células se cultivaron en matraces de cultivo T-75 y cuando se alcanzó una confluencia del 50 % los medios de cultivo fueron retirados, las células lavadas en 1xPBS y tratadas con 20 µg/ml de los anticuerpos diluidos en 5 ml de medio que contenía FBS 0,5 %. Las células fueron tratadas durante 48 horas, después de lo cual se prepararon los lisados de células completas utilizando un tampón RIPA estándar. La concentración de proteína total fue determinada en cada muestra y se analizó 1-10 µg de proteína mediante transferencia Western utilizando anticuerpos primarios contra EGFR, HER2 o HER3. Se usó como control de carga un anticuerpo contra la β-actina.

Resultados

Los resultados del análisis de la transferencia Western (Figura 7) muestran que las mezclas de anticuerpos contra un solo receptor (EGFR, HER2 o HER3) inducen la degradación de su respectiva diana y que una mezcla de pan-HER que consiste en una combinación de mezclas de anticuerpos contra cada diana es capaz de inducir la

degradación eficiente de los tres receptores de manera simultánea.

Ejemplo 6: Actividad inhibitoria del cáncer de las mezclas de anticuerpo pan-HER

5 Utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 3, las mezclas de anticuerpo Sym004 (que contienen los dos anticuerpos anti-EGFR 992+1024 descritos en el documento WO 2008/104183), 1277+1565 (anti-EGFR), 1254+1565 (anti-EGFR), 4385+4318 (anti-HER2), 4384+4517 (anti-HER2), 5038+5082 (anti-HER3), las mezclas de anticuerpo pan-HER 1565+4517+5082 y 1277+4384+5082 (un anticuerpo contra cada uno de EGFR, HER2 y HER3) y 1277+1565+4384+4517+5038+5082 y 1277+1565+4385+4518+5038+5082 (dos anticuerpos contra cada uno de EGFR, HER2 y HER3), los anticuerpos de referencia cetuximab (anti-EGFR), trastuzumab (anti-HER2), 8736 (MM-121 análogo; anti-HER3) y una mezcla de los tres anticuerpos de referencia, junto con un anticuerpo control negativo fueron probados para determinar su capacidad de inhibir el crecimiento y la proliferación de 22 líneas celulares cancerosas que son dependientes de EGFR o HER2, EGFR/HER2, HER2/HER3 o EGFR/HER2/HER3 . Los resultados de las titulaciones de las mezclas de anticuerpo y los anticuerpos mencionados anteriormente contra las cinco líneas celulares A431NS (EGFR), H358 (EGFR), HCC202 (HER2), OE19 (HER2) y H820 (EGFR) se muestran en las Figuras 8-12.

Resultados

20 Se puede observar a partir de los resultados en las Figuras 8-12 que aunque el efecto de las mezclas de anticuerpo y los anticuerpos individuales varía entre las diferentes líneas celulares, las mezclas de anticuerpo pan-HER que contienen anticuerpos contra cada uno de los tres receptores EGFR, HER2 y HER3 son en general eficaces para inhibir el crecimiento y la proliferación celulares. Las mezclas de pan-HER que contienen seis anticuerpos, es decir dos anticuerpos contra cada uno de los tres receptores, son en general las más eficaces en las líneas celulares.

25 Ejemplo 7: Degradación de EGFR, HER2 y HER3 con una combinación de mezclas de anticuerpos

Este ejemplo demuestra que las mezclas de anticuerpos inducen la degradación de su diana (EGFR, HER2 o HER3) y que las combinaciones de mezclas contra las tres dianas pueden inducir la degradación de los tres receptores simultáneamente.

Métodos

35 Para investigar el nivel de degradación de EGFR, HER2 y HER3 inducida por las mezclas de anticuerpos y combinaciones de las mezclas, se realizaron análisis de transferencia Western en los lisados de células completas de las células H292 y OVCAR-8 tratadas con el anticuerpo durante 48 horas. Las células se cultivaron en matraces de cultivo T-75 y cuando se alcanzó una confluencia del 50 % los medios de cultivo fueron retirados, las células lavadas en 1xPBS y tratadas con 20 µg/ml de los anticuerpos diluidos en 5 ml de medio que contenía FBS 0,5 %. Las células fueron tratadas durante 48 horas, después de lo cual se prepararon los lisados de células completas utilizando un tampón RIPA estándar. La concentración de proteína total fue determinada en cada muestra y se analizó 1-10 µg de proteína mediante transferencia Western utilizando anticuerpos primarios contra EGFR, HER2 o HER3. Se usó como control de carga un anticuerpo contra la β-actina.

Resultados

45 Los resultados de la investigación de la transferencia Western (Figura 13) muestran que las mezclas de anticuerpos contra un solo receptor (EGFR, HER2 y HER3) inducen la degradación de su diana respectiva y que una mezcla de pan-HER que consiste en una combinación de mezclas de anticuerpos contra cada diana, es capaz de inducir la degradación eficiente de los tres receptores de manera simultánea.

50 En la línea celular H292 se puede observar una pequeña disminución en el EGFR total en las células tratadas con los anticuerpos anti-EGFR 1277, 1565 y la mezcla de pan-HER que consiste en un anticuerpo contra cada uno de EGFR, HER2 y HER3 (1277+4384+5082), pero no en células tratadas con el anticuerpo comparador anti-EGFR cetuximab. Una mezcla de 1277+1565 da como resultado una degradación eficiente de EGFR, lo cual también se observa con la mezcla de pan-HER que consiste en dos anticuerpos contra cada diana (1277+1565+4384+4517+5038+5082). Una combinación de anticuerpos anti-HER2 (4384+4517) indujo la degradación de HER2 tanto solo como formando parte de la mezcla de pan-HER 1277+1565+4384+4517+5038+5082.

60 Como en H292, se observa una pequeña disminución en el EGFR total en los lisados de OVCAR-8 en las células tratadas con los anticuerpos individuales 1277 y 1565 y la mezcla pan-HER 1277+4384+5082. La combinación 1277+1565 y la mezcla pan-HER 1277+1565+4384+4517+5038+5082 indujo una degradación muy eficiente de EGFR. Los anticuerpos monoclonales anti-HER2 tuvieron un efecto mínimo sobre el HER-2 total, mientras que las combinaciones de anticuerpos contra HER2 (dieron como resultado una degradación eficiente del receptor. Todos los anticuerpos y las mezclas de anticuerpos contra HER3 provocaron la degradación del receptor en las células OVCAR-8.

En las células H292, se puede observar una regulación al alza de HER2 en respuesta al tratamiento de las células con los anticuerpos individuales (cetuximab, 1277 y 1565) o una mezcla de anticuerpos (1277+1565) contra EGFR. Esto no se observa en las células tratadas con la mezcla de anticuerpo pan-HER que consiste en dos anticuerpos contra cada diana (1277+1565+4384+4517+5038+5082) ya que el EGFR, HER2 y HER3 son todos simultáneamente degradados en este contexto. En las células OVCAR-8 puede observarse una regulación al alza de HER2 en las células tratadas con los anticuerpos o mezclas de anticuerpos contra HER3. Nuevamente, esto no se observa en las células tratadas con la mezcla de anticuerpo pan-HER que consiste en dos anticuerpos contra cada diana (1277+1565+4384+4517+5038+5082) debido a la degradación simultánea del receptor. La regulación al alza del receptor no se observó en las células tratadas con la mezcla de anticuerpo pan-HER (1277+4384+5082). De este modo, el tratamiento de las células con una mezcla de pan-HER previene potencialmente la aparición de resistencia como resultado de la regulación al alza del receptor, ya que los tres receptores (EGFR, HER2 y HER3) son degradados después del tratamiento con la mezcla del anticuerpo pan-HER.

Ejemplo 8: Actividad inhibitoria del cáncer de las mezclas de anticuerpo pan-HER.

Este ejemplo describe la actividad inhibitoria superior del cáncer de las mezclas de anticuerpo pan-HER que consisten en un anticuerpo contra cada una de las dianas EGFR, HER2 y HER3, es decir una mezcla pan-HER que contiene un anticuerpo contra cada diana, de las mezclas pan-HER que contienen un anticuerpo contra dos dianas (EGFR y HER3) y dos anticuerpos contra una diana (HER2) y de una mezcla pan-HER que consiste en dos anticuerpos contra cada receptor, es decir EGFR, HER2 y HER3.

Métodos

Utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 3 las mezclas de anticuerpo contra cada receptor 1277+1565 (anti-EGFR) , 4384+4517 (anti-HER2) y 5038+5082 (anti-HER3), una mezcla pan-HER con dos anticuerpos contra cada receptor (1277+1565+4384+4517+5038+5082), las mezclas pan-HER que incluyen un anticuerpo contra EGFR, dos anticuerpos contra HER2 y un anticuerpo contra HER3 (1277+4384+4517+5038 o 1277+4384+4517+5082), las mezclas pan-HER que consisten en un anticuerpo contra cada receptor (1277+4384+5038 y 1277+4384+5082), los anticuerpos de referencia cetuximab (anti-EGFR), trastuzumab (anti-HER2), el análogo MM-121 (anti-HER3), una mezcla de los tres anticuerpos de referencia y un anticuerpo control negativo se probaron para determinar la capacidad de inhibir el crecimiento y la proliferación de 11 líneas de células cancerosas que son dependientes de EGFR o HER2, EGFR/HER2, EGFR/HER3, HER2/HER3 o EGFR/HER2/HER3. Los resultados de la titulación de las mezclas de anticuerpos y los anticuerpos mencionados anteriormente en las siete líneas celulares A431NS, N87, A549, OE19, BT474, MDA-MB-175 VII y HCC202 se muestran en las Figuras 14-20.

Resultados

Los resultados presentados en las Figuras 14-20 muestran que aunque el efecto de las mezclas de anticuerpos y los anticuerpos individuales varía entre las diferentes líneas celulares, las mezclas de anticuerpo pan-HER comprendidas por tres, cuatro o seis anticuerpos contra los tres receptores EGFR, HER2 y HER3, son en general muy eficaces para inhibir el crecimiento y la proliferación de las células cancerosas. Como se describe en el Ejemplo 5, la mezcla pan-HER que contiene seis anticuerpos, es decir, dos anticuerpos cada uno contra los tres receptores es en general la más eficaz en las líneas celulares probadas.

Ejemplo 9: Actividad Inhibitoria del cáncer de las mezclas de anticuerpos pan-HER

Este ejemplo describe que la selección como diana de tres receptores de la familia HER (EGFR/HER2/HER3) de manera simultánea con una combinación de mezclas de anticuerpos da como resultado un perfil inhibitorio más amplio en comparación con la selección como diana de dos receptores de la familia HER (EGFR/HER2, EGFR/HER3 o HER2/HER3) al mismo, tiempo o la la selección como diana de los tres receptores solos.

Métodos

Utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 3, las mezclas de anticuerpo contra cada receptor 1277+1565 (anti-EGFR), 4384+4517 (anti-HER2) y 5038+5082 (anti-HER3), todas las posibles permutaciones de estos, es decir 1277+1565+4384+4517 (anti-EGFR+anti-HER2), 1277+1565+5038+5082 (anti-EGFR+anti-HER2) y 4384+4517+5038+5082 (anti-HER2+antiHER3), una mezcla pan-HER con dos anticuerpos contra cada receptor (1277+1565+4384+4517+5038+5082), las mezclas pan-HER que consisten en un anticuerpo contra cada receptor (1277+4384+5038 y 1277+4384+5082), los anticuerpos de referencia, cetuximab (anti-EGFR), trastuzumab (anti-HER2), el análogo MM-121 (anti-HER3), una mezcla de los tres anticuerpos de referencia y un anticuerpo control negativo, se probaron para determinar su capacidad de inhibir el crecimiento y la proliferación de 11 líneas de células cancerosas que son dependientes de EGFR o HER2, EGFR/HER2, EGFR/HER3, HER2/HER3 o EGFR/HER2/HER3. Los resultados de la titulación de las mezclas de anticuerpo y los anticuerpos listados anteriormente contra las cinco líneas celulares A431NS, AU565, H358, H1975 y HCC202 se muestran en las Figuras 21-25.

Resultados

En A431NS las combinaciones de mezclas contra EGFR y HER2 o EGFR y HER3 dan como resultado un incremento sinérgico en la inhibición del crecimiento de las células cancerosas concurrente con los resultados descritos en el Ejemplo 3. Una combinación de mezclas que se dirigen a HER2 y HER3 no tuvo efecto inhibitorio sobre las células A431NS. Una combinación de las mezclas de anticuerpo contra EGFR, HER2 y HER3 fue superior a las mezclas individuales y a las mezclas de anticuerpo con un solo anticuerpo contra cada uno de los tres receptores y tan efectivas como las combinaciones de mezclas contra dos receptores.

Se obtuvieron resultados similares con la línea celular H1975. Nuevamente, las combinaciones de mezclas de anticuerpos contra EGFR y HER2 o EGFR y HER3 mostraron un incremento sinérgico en el efecto inhibitorio. Una combinación de las mezclas de anticuerpo contra EGFR, HER2 y HER3 fue superior a las mezclas individuales y a las mezclas de anticuerpo con solo un anticuerpo contra cada uno de los tres receptores y tan efectiva como las combinaciones de mezclas contra dos receptores.

En la línea celular HCC202, combinaciones de mezclas contra HER2 y EGFR o HER2 y HER3 tenían un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la proliferación de las células cancerosas. Una combinación de mezclas de anticuerpos contra EGFR, y HER3 no tuvo efecto inhibitorio sobre las células HCC202. Una combinación de las mezclas de anticuerpos contra EGFR, HER2 y HER3 fue superior a las mezclas individuales, a las combinaciones de mezclas contra dos receptores y a las mezclas de anticuerpo con solo un anticuerpo contra cada uno de los tres receptores.

Se observaron resultados similares en la línea celular AU565. Las combinaciones de mezclas contra HER2 y EGFR o HER2 y HER3 tuvieron un efecto inhibitorio incrementado sobre el crecimiento y proliferación de las células cancerosas. Una combinación de mezclas anticuerpos contra EGFR y HER3 no tuvieron ningún efecto inhibitorio sobre las células AU565. Una combinación de las mezclas de anticuerpo contra EGFR, HER2 y HER3 fue superior a las mezclas individuales, a las combinaciones de mezclas contra dos receptores y a las mezclas de anticuerpos con solo un anticuerpo contra cada uno de los tres receptores.

En la línea celular H358 las combinaciones de mezclas contra EGFR y HER2 dieron como resultado un pequeño incremento en el efecto inhibitorio comparado con la selección como diana solo de EGFR. La selección como diana de HER2 y HER3 con una combinación de mezclas dio como resultado un efecto inhibitorio modesto sobre el crecimiento y proliferación de las células cancerosas comparable a la selección como diana de HER3 solo. No obstante, las combinaciones de mezclas contra los tres receptores dieron como resultado una inhibición incrementada del crecimiento y proliferación celulares, que fue superior a las de las mezclas individuales, a las combinaciones de mezclas contra dos receptores y a las mezclas de anticuerpo solo con un anticuerpo contra cada uno de los tres receptores.

En resumen, los resultados presentados en éste ejemplo demuestran que la selección como diana óptima de más de un receptor de la familia HER se obtiene mediante la combinación de las mezclas de anticuerpos contra cada receptor, que la selección como diana de tres receptores es superior a la selección como diana de dos receptores y que la selección como diana de cada receptor con una mezcla de anticuerpos es superior a la selección como diana de cada receptor con un solo anticuerpo.

Ejemplo 10: Eficacia *in vivo* de las mezclas de anticuerpos pan-HER en el modelo de xenoinjerto de tumor humano A431NS

Para evaluar la eficacia *in vivo* de las mezclas de anticuerpo contra EGFR, HER2, HER2 y las combinaciones de los tres receptores, se probaron los anticuerpos y las mezclas en el modelo de xenoinjerto de tumor humano A431NS. La línea de células de carcinoma epidérmico humano A431 que sobreexpresa EGFR se utiliza mucho cuando se prueban los efectos inhibitorios del crecimiento de los nuevos compuestos anti-EGFR tanto *in vitro* como *in vivo*. En los estudios *in vivo* presentados aquí se ha utilizado una variante que crece más agresivamente, A431NS (ATCC N.º CRL-2592), de la línea celular progenitora A431. Los resultados se muestran en la Figura 26.

Método

Se inocularon por vía subcutánea 2×10^6 células A431NS en el flanco izquierdo de ratones desnudos atímicos hembras de ocho semanas de edad. Los tumores fueron medidos dos veces a la semana con calibradores y el volumen tumoral en mm^3 fue calculado de acuerdo a la fórmula: $(\text{anchura})^2 \times \text{longitud} \times 0,5$. A un tamaño de tumor promedio de 175 mm^3 los ratones fueron aleatorizados y se inició el tratamiento. Los ratones fueron tratados con inyecciones intraperitoneales dos veces a la semana de 50 mg/kg/diana durante 2,5 semanas (5 inyecciones en total) seguido por un periodo de observación. De este modo, la selección como diana de un receptor dio como resultado la administración de 50 mg/kg, mientras que a los ratones tratados con una combinación de anticuerpos que tienen como diana dos o tres receptores se les administró 100 o 150 mg/kg, respectivamente. En el experimento se incluyeron las siguientes combinaciones de anticuerpos: 1277+1565 (anti-EGFR), 4384+4517 (anti-HER2), 5038+5082 (anti-HER3), 1277+1565+4384+4517 (anti-EGFR+anti-HER2), 1277+1565+5038+5082 (anti-

EGFR+anti-HER3), 4384+4517+5038+5082 (anti-HER2+anti-HER3), 1277+4384+5038 (anti-EGFR+anti-HER2+anti-HER3) y 1277+1565+4384+4517+5038+5082 (anti-EGFR+anti-HER2+anti-HER3). El experimento también incluyó el anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab y el anticuerpo monoclonal anti-HER2 trastuzumab, los cuales fueron dosificados y administrados como se describe para las mezclas de anticuerpos anteriores.

5 *Resultados*

El día 12 después de la inoculación a un tamaño de tumor promedio de 175 mm³ los ratones fueron aleatorizados en 11 grupos de ocho animales y se inició el tratamiento. Los animales tratados con anticuerpos que tienen como diana EGFR+HER3 (1277+1565+5038+5082) y EGFR+HER2 +HER3 (mezcla pan-HER: 1277+4384+5038 y mezcla pan-HER: 1277+1565+4384+4517+5038+5082) fueron muy eficientes en el control del crecimiento tumoral. Casi no se observó ningún aumento del tamaño del tumor en el periodo de tratamiento en los grupos tratados con anti-EGFR+anti-HER3 (1277+1565+5038+5082) y anti-EGFR+anti-HER2 +anti-HER3 (mezcla pan-HER: 1277+4384+5038 y mezcla pan-HER: 1277+1565+4384+4517+5038+5082). Los animales tratados con anticuerpos contra EGRF (1277+1565) o HER3 (5038+5082) o combinaciones que tienen como diana EGFR+HER2 (1277+1565+4384+4517) y HER2+HER3 (4384+4517+5038+5082) seguían mostrando crecimiento tumoral en el periodo de tratamiento, aunque los tumores crecieron a una velocidad más lenta en comparación con el control con vehículo. Los animales tratados con anti-HER3 y las combinaciones de anticuerpos anti-HER2+anti-HER3 mostraban solamente tumores ligeramente más pequeños en comparación con el grupo control con vehículo. Los grupos tratados con anti-EGFR (1277+1565) o anti-EGFR+anti-HER2 (1277+1565+4384+4517) mostraron inhibición del tumor y una velocidad de crecimiento más lenta en comparación con el control de vehículo.

En el periodo de observación, todos los grupos tratados con anti-HER3, anti-EGFR+anti-HER2, anti-HER2+anti-HER3 y cetuximab seguían mostrando crecimiento tumoral aunque a un ritmo más lento en comparación con el grupo control de vehículo. En general, los grupos tratados con anticuerpos anti-EGFR y las mezclas que incluían las combinaciones de anticuerpos contra EGFR mostraban una velocidad de crecimiento tumoral más lenta en comparación con los grupos tratados con las mezclas de anticuerpo contra HER3 o combinaciones de mezclas contra HER2+HER3.

Todos los grupos tratados con combinaciones de mezclas de anticuerpos que tienen como diana EGFR+HER3 y EGFR+HER2 +HER3 (mezcla pan-HER 6) y una combinación de un anticuerpo contra cada uno de los tres receptores (mezcla pan-HER 3), mantenían el control del crecimiento tumoral a todo lo largo del experimento.

La mayor eficacia observada en los experimentos in vitro (Ejemplo 2) de la selección como diana simultánea de EGFR y HER3 en el modelo de xenoinjerto de tumor A431NS, refleja las dependencias del receptor ErbB conocidas para esta línea celular. Aunque es principalmente dependiente de la señalización de EGFR, la línea celular A431NS también es dependiente de la interferencia entre EGFR y HER3 y en cierto grado entre EGFR y HER2, aunque en el presente experimento *in vivo* esta última no se observa.

En resumen, los resultados presentados en este experimento muestran que el tratamiento de los xenoinjertos de tumores A431NS con una combinación de anticuerpos o mezclas de anticuerpos contra EGFR+HER3 o EGFR+HER2+HER3 es más efectiva en comparación a la selección como diana de tumores con anticuerpos monoclonales y mezclas de anticuerpos contra las dianas individuales EGFR, HER2 y HER3, o combinaciones de anticuerpos monoclonales y mezclas de anticuerpos contra EGFR+HER2 o HER2+HER3.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Symphogen A/S
- <120> Mezclas de Anticuerpos Pan-HER
- <130> P141PC00
- <150> PA 2010 00988
- <151> 01-10-2010
- <150> PA 2011 00672
- <151> 05-09-2011
- <150> US 61/408.782
- <151> 01-11-2010
- <150> US 61/531.407
- <151> 06-09-2011
- <160> 150

ES 2 616 961 T3

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 1

```

cgcgccgagg tccaactgca gcaacctggg tctgagctgg tgaggcctgg agcttcagtg      60
aagctgtcct gcaaggcttc tggctacaca ttcaccagct actggatgca ctgggtgaag      120
cagaggcctg gacaaggcct tgagtggatt gggaatattt atcctggtag tcgtagtact      180
aactacgatg agaagttcaa gagcaaggcc aactgactg tagacacatc ctccagcaca      240
gcctacatgc agctcagcag cctgacatct gaggactctg cggcttatta ctgtacaaga      300
aatggggatt actacgttag tagcgggat gctatggact actgggtca aggaacctca      360
gtcaccgtct cg                                                              372
  
```

15 <210> 2
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 2

```

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

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

Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
35         40         45

Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Arg Ser Thr Asn Tyr Asp Glu
50         55         60

Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr
65         70         75         80

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

Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Val Ser Ser Gly Asp Ala Met
100        105        110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115        120
  
```

20 <210> 3
 <211> 648

ES 2 616 961 T3

<212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 3

5

```

ctagccgaca ttcagatgac tcagactaca tcctcctgt ctgcctctct gggagacaga      60
gtcaccatca gttgcaggac aagtcaggac attggcaatt atttaaactg gtatcagcag      120
aaaccagatg gaactgttaa actcctgac tactacacat caagattaca ctcaggagtc      180
ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga acagatTTTT ctctcaccat taacaacgtg      240
gagcaagagg atgttgccac ttacttttgc caacactata atacggttcc tccgacgttc      300
ggtggaggca ccaagctgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttoatcttc      360
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac      420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggTggata acgccctcca atcgggtaac      480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc      540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat      600
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt      648
  
```

<210> 4
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 4

10

ES 2 616 961 T3

Leu Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Asn Asn Val
 65 70 75 80
 Glu Gln Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Tyr Asn Thr Val
 85 90 95
 Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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> 5
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 5

ES 2 616 961 T3

cgcgcccagg tccaactgca gcagcctggg gctgaactgg tggagcctgg gggttcagtg 60
 aagctgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttcaccagtc actggatgca ctgggtgaag 120
 cagaggcctg gacaaggcct tgagtggata ggtgagatta atcctagcag cggtcgtaat 180
 aactacaatg agaagttcaa gagtaaggcc aactgactg tagacaaatc ctccagcaca 240
 gcctacatgc aattcagcag cctgacatct gaggactctg cggtctatta ttgtgtaaga 300
 tactatgggtt acgacgaagc tatggactac tggggtaag gaacctcagt caccgtctcg 360

<210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 6

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

10

<210> 7
 <211> 663
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 7

ES 2 616 961 T3

```

ctagccgaca tcgtgatgac acaagctgca ttctccaatc cagtcaactct tggaacatca      60
gcttccatct cctgcaggtc tagtaagagt ctctacata gtaatggcat cacttatttg      120
tattggtatc tgcagaagcc aggccagtct cctcagctcc tgatttatca gatgtccaac      180
cttgccctcag gagtcccaga caggttcagt agcagtgggt caggaactga tttcacactg      240
agaatcagca gagtggaggc tgaggatgtg ggtgtttatt actgtgctca aaatctagaa      300
cttccgtaca cgttcggagg ggggaccaag ctggaaataa aacgaactgt ggctgcacca      360

tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttg      420
tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtgaaggt ggataacgcc      480
ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac      540
agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc      600
tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag      660

tgt                                                                 663

```

<210> 8
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 8

5

ES 2 616 961 T3

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

<210> 9
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 9

ES 2 616 961 T3

cgcgccgaag tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttag tgaagcctgg agggtcctcg 60
 aaactctcct gtgcagcctc tggattcact ttcagtagtt atgcctgtc ttgggttcgc 120
 cagactccag agaggaggct ggagtgggtc gcatccatta gtggtggttg tagcacctac 180
 tttccagaca gtgtgaaggg cggtttcacc atgtccagag ataatgccag gaacatcctg 240
 tacctccaaa tgagcagtct gaggtctgag gacacggcca tgtattactg tgcaagaggt 300
 tctgatggtt acttctatgc tatggactac tggggccaag gaacctcagt caccgtctcg 360

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 10

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

10

<210> 11
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 11

ES 2 616 961 T3

```

ctagccgaca ttgtgctgac tcagtctcct gcttccttag ctgtatctct ggggcagagg      60
gccaccattt catgcagggc cagcaaaagt gtcagtacat ctggctatag ttttatgcac      120
tggtagcaaac tgaaaccagg acagccaccc aaactcctca tctatcttgc atccaaccta      180
gaatctgggg tccctgccag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt caccctcaac      240
atccatcctg tggaagagga ggatgctgca acctattact gtcagcacag tagggagttt      300
ccgttaacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaac gaactgtggc tgcaccatct      360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc      420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc      480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gacagggaca gcaaggacag cacctacagc      540
ctcagcagca cctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc      600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt      660

```

<210> 12
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 12

```

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

```

```

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

```

```

Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Gln
          35             40             45

```

```

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

```

```

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

```

10

ES 2 616 961 T3

Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His
85 90 95

Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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

<210> 13
<211> 366
5 <212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 13

cgcgccgaag tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttag tgaagcctgg aggggtccctg 60
aaactctcct gtgcagcctc tggattcgct tacagtacct atgacatgtc ttgggttcgc 120
cagactccgg agaagaggct ggagtgggtc gcatacatta gtagtgggtg tgatgccgcc 180
tactatcccg aactgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaatgc caaaaacacc 240
ctatacctgc aatgagcag tctgaagtct gaggacacag ccatgtatta ctgtgcgagg 300
tctcgctatg gaaactacgg ggacgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 360
10 gtctcg 366

<210> 14
<211> 122
15 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 14

ES 2 616 961 T3

Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Tyr Ser
 20 25 30

Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Asp Ala Ala Tyr Tyr Pro Asp
 50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Ser Arg Tyr Gly Asn Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 660
 <212> ADN

5

<213> *Mus musculus*

<400> 15

10

ctagccgatg ttgtgatgac acagactcca ctctccctgc ctgtcagtct tggagatcaa 60

gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc ottgtacaca gtaatggtaa cacctattta 120

cattggtacc tgcagaagcc aggccagtct ccaaagctcc tgctctacaa agtttccaac 180

cgattttctg ggggtcccaga caggttcagt ggcagtgat cagggacaga tttcacactc 240

aagatcagca gagtggagtc tgaggatctg ggagtttatt tctgctctca aaatacacat 300

gtgtacacgt tgggaggggg gacaaagttg gaaataaaac gaactgtggc tgcaccatct 360

gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420

ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 480

caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540

ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600

gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660

<210> 16
 <211> 220

ES 2 616 961 T3

<212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 16

5

```

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

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

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

Gln Ser Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
50          55          60

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

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser
85          90          95

Gln Asn Thr His Val Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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
  
```

<210> 17
 <211> 354

ES 2 616 961 T3

<212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 17

5

```

cgcgccgaag tgcagctggt ggagctctggg ggaggcttag tgaagcctgg agagtccttg      60
aaactctcct gtgcagcctc tggattcgtt ttcagttact ctgacatgtc ttgggttgc      120
cagactccgg agaagaggct ggagtgggtc gcatacatga gtagtgctgg tgatgtcacc      180
ttctattcag aactgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaatgc caagaacacc      240
ctgtatctgc aagtgagcag tctgaagtct gaggacacag ccatatatta ctgtgtaaga      300
caccgggacg tggctatgga ctactggggg caaggaacct cagtcaccgt ctcg          354
  
```

<210> 18
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 18

```

Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
1              5              10              15

Gly Glu Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser
                20              25              30

Tyr Ser Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
                35              40              45

Trp Val Ala Tyr Met Ser Ser Ala Gly Asp Val Thr Phe Tyr Ser Asp
                50              55              60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Arg Asp Val Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
                100             105             110

Thr Ser Val Thr Val Ser
                115
  
```

15

<210> 19
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 19

ES 2 616 961 T3

ctagccgatg ttgtgatgac ccagactcca ctctccctgc ctgtcagtct tggagatcaa 60
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc cttgtacaca gtaatggaaa cacctattta 120
cattggtacc tgcagaagcc aggccagtct ccaaagctcc tgatctacaa agtttccaac 180
cgattttctg gggcccaga caggttcagt ggcaagtggat cagggacaga tttcacactc 240
aagatcagca gagtggaggc tgaggatctg ggagtttatt tctgctctca aagtacacat 300
gttccgacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gacaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660

<210> 20
<211> 220
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5

<400> 20

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

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

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

Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser
85 90 95

Gln Ser Thr His Val Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

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

10

ES 2 616 961 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> 21
 <211> 370
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 21

ggcgcgccga ggtccaactg caacagtctg ggactgaatt ggtgaagcct ggggcttcag 60
 tgatactgtc ctgtaaggcc tctggctaca ccttcaccag ctactggatg cagtgggtga 120
 agcagaggcc tggacaaggc cttgagtgga ttggaaatat taatcctagc aatggtggaa 180
 ctagtttcaa tgaggagttc aagagtaggg ccacactgac tgtagacaaa tcctccagta 240
 cagcctacat gcaactcagc agcctgacat ctgaggactc tgcggtctat tattgtgcaa 300
 gagacggggg cctttacgac ggatactact ttgacttctg gggccaaggc accactctca 360
 cagtctcgag 370

10

<210> 22
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 22

ES 2 616 961 T3

Arg Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro
 1 5 10 15

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

Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Phe Asn Glu
 50 55 60

Glu Phe Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Leu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 663
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 23

gctagccaac attgtgatga cacagtctca caaatcctatg tccacattaa taggagccag 60

ggtctccatc acctgcaagg ccagtcagga tgtggatacg gctgtagcct ggtatcaaca 120

gaaaccaggt caatctocta aattattaat ttattgggca tccaccggc aactggagt 180

ccctgatcgc ttcacaggca gtggatctgg gacagatttc tctctcaccg ttagcaatgt 240

gcagtctgag gacttaacag attatttctg tcagcaatat agcagctatc ctctcacgtt 300

cggtgctggg accaagctgg agctgaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt 360

cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa 420

cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa 480

ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac 540

cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca 600

tcagggcctg agctogcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aataagcggc 660

cgc 663

10

<210> 24
 <211> 216

ES 2 616 961 T3

<212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 24

5

```

Leu Ala Asn Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Leu
1          5          10          15
Ile Gly Ala Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp
          20          25          30

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

Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe
          50          55          60

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Val Ser Asn Val
65          70          75          80

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

Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu 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> 25
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10

ES 2 616 961 T3

<400> 25

```

gaagtgcagc tgcagcagtc tggccccgag ctggtgaaac ctggcgcctc cgtgaagatc      60
tcttgcaccg cctccggcta caccttcacc gactactaca tgaactgggt gaaacagtcc      120
cacggaaagt ccctggaatg gatcggagac atcaacccca acaacggcgg caccaactac      180
aaccagaagt ggaagggcaa ggccaccctg accatccaca agtcctccag cacgcctac      240
atggaactgc ggtccctgac ctccgaggac tccgccgtgt acttctgtgt gcctggcggc      300
ctgcggtcct acttcgatta ctggggccag ggcaccaccc tgacagtetc g                351
    
```

5 <210> 26
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 26

```

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
      35                40                45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Trp
 50                55                60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile His Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65                70                75                80

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

Val Pro Gly Gly Leu Arg Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100                105                110

Thr Leu Thr Val Ser
      115
    
```

15 <210> 27
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 27

ES 2 616 961 T3

gacatcgtga tgaccagtc cctgaagttc atgtccgect ccgtgggcca ccgggtgtcc 60
atcacatgca aggcctccca ggatgtgtct gccgccgtgg cctggtatca gcagaagcct 120
ggccagtccc ccgagctgct gatctactgg gcctctaccc ggcacaccgg cgtgcccgac 180
agattcacgg gctctggctc cggcacccgac tacaccctga ccatctccag cgtgcaggcc 240
gaggacctgg ccctgtacta ctgccagcag cactacacca cccccccac ctccggcgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa gccgaccgtg gccgctccct ccgtgttcat ctcccaccc 360
tccgacgagc agctgaagtc cggcacccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420
ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtcagg caactcccag 480
gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtcctc caccctgacc 540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 28
<211> 214
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5

<400> 28

ES 2 616 961 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Leu Lys Phe Met Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ala Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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> 29
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 29

ES 2 616 961 T3

caggtgcagc tgcagcagcc tggcacagag ctggtgaaac ctggcgcctc cgtgaagctg 60
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc tcccactgga tgcaactgggt gaaacagcgg 120
 cctggacagg gcttggaatg gatcggcaac atcaaccctt ccaacggcgg caccaactac 180
 aacgagaagt tcaagtcccg ggccacccctg accgtggaca aggcctcctc caccgcctac 240
 atgcagctgt cctccctgac ctccgaggac tccgcctgt actactgcgc cagagcctac 300
 tacgacttca gttggttcgt gtactggggc cagggcaccc tggtgacagt ctcg 354

5 <210> 30
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 30

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

10 <210> 31
 <211> 639
 <212> ADN
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 31

ES 2 616 961 T3

```

gatatccaga tgaccagac ctccctccagc ctgtccgcct ccctgggcca cagagtgacc      60
atctcctgcc ggtcctccca ggacatctcc aactacctga actgggtatca gcagaaacct      120
gacggcaccg tgaagctgct gatgtacatc tcccggctgc actccggcgt gccctccaga      180
ttctccggct ctggctccgg caccgagtac tccctgacca tcagcaacct ggaacaggaa      240
gatatcgcta cctacttctg tcagcagggc aacaccctgc ccctgacctt cggcgctggc      300
accaagctgg aactgaagcg gaccgtggcc gtcctcctcg tgttcattctt cccaccctcc      360
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc      420
cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgcctcgc agtccggcaa ctcccaggaa      480
tccgtgaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgtcctccac cctgaccctg      540
tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg      600
tccagccccg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgc      639
    
```

<210> 32
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 32

```

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

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

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

Tyr Ile Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60

Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
65           70           75           80
    
```

10

ES 2 616 961 T3

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

5 <210> 33
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 33

caggtgacac tgaaagagtc tggcgccgag ctgatgaagc ctggcgcctc cgtgaagctg 60

tcctgcaagg ccaccggcta caccttcacc ggctactgga togagtgggt gaaacagcgg 120

cctggacacg gcctggaatg gatcggagag atcctgcctg gctccggctc caccaactac 180

aacgagaagt tcaagggcga ggccaccttt accgccgaca cctcctccaa caccgcctac 240

atgcacctgt cctccctgac caaccgaggac tccgccatct actactgcgc cagatggggc 300

10 gacggctcct tcgcttattg gggccagggc accctggtga cagtctcg 348

15 <210> 34
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 34

ES 2 616 961 T3

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Gly Asp Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser
 115

<210> 35
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 35

gatatcgtga tgaccacgct ccagaaattc atgtccacct ccgtgggcca ccgggtgtcc 60

atcacatgca aggcctccca gaacgtgggc accgccgtgt cctggtatca gcagaagccc 120

ggccagtccc ccaagctgct gatcttctcc acctccaacc ggtacaccgg cgtgcccggc 180

agattcaccg gctctggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatctccaa catgcagtcc 240

gaggacctgg ccgactactt ctgccagcag taccggtcct accccttcac ctteggcagc 300

ggcaccaagc tggaaatcaa gcgaccgtg gccgctccct ccgtgttcat ctcccacccc 360

tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420

ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtcgga caactcccag 480

gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtctct caccctgacc 540

ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gc 642

10

<210> 36
 <211> 214
 <212> PRT

ES 2 616 961 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 36

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Ser Thr Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Arg Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu 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> 37
 <211> 360
 <212> ADN

ES 2 616 961 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 37

```

gaagtgcagc tggtggaatc tggcggcgac ctggtgaaac ctggcggctc cctgaagctg      60
tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc agctacggca tgcctgggt gcgactgacc      120
cccgacaagc ggctggaatg ggtggcaacc atctccggcg gaggtccta cacctactac      180
cccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggata tgcccaagtc cacctgtac      240
ctgcagatgt cctccctgaa gtccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccggaagggc      300
5 aactacggca attacggcaa gctggcctac tggggccagg gcacctcctg gacagtctcg      360

```

<210> 38

<211> 120

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 38

```

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30

Gly Met Ser Trp Val Arg Leu Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

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

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

Ala Arg Lys Gly Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Lys Leu Ala Tyr Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115          120

```

15

<210> 39

<211> 642

<212> ADN

20 <213> *Mus musculus*

<400> 39

ES 2 616 961 T3

```

gatatccaga tgacccagtc ccccgctcc ctgtccgtgt ctgtgggcca gacagtgacc      60
atcacctgtc gggcctccga gaacatctac tccaacctgg cctggtatca gcaggaacag      120
ggcaagtccc ccagctgct ggtgtacgcc gccaccaatc tggccgacgg cgtgccctcc      180
agattctccg gctctggctc cggcaccag tactccctga agatcaactc cctgcagtcc      240
gaggacttcg gctcctaacta ctgccagcac ttctggggca cccctggac ctccggcgga      300
ggcaccaagc tggaaatcaa gcggaccgtg gccgctccct ccgtgttcat ctcccaccc      360
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac      420
ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgcc tgcagagcgg caactcccag      480
gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact cctgtctctc caccctgacc      540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc      600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gc                          642

```

<210> 40
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 40

ES 2 616 961 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Glu Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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> 41
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 41

ES 2 616 961 T3

gaagtgcagc tgcagcagtc tggcgccgac ctggtgaaac ctggcgccctc cgtgaagctg 60
 tcctgcacca cctccggctt caacatcaag gacatcttca tccactgggt gaaagagcgg 120
 cccgagcagg gcctggaatg gatcggacgg atcgaccccg ccaacgacaa ccctaagtac 180
 gacccaagt tccagggcaa ggccaccatc tccgcccaca cctccagcaa caccgcctac 240
 ctgcggtgt cctccctgac ctctgaggac accgccgtgt actactgcgc tggcggccct 300
 gcctacttgc actattgggg ccagggcacc accctgacag tctcg 345

<210> 42
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 42

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Pro Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Gly Gly Pro Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser
 115

10

<210> 43
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 43

ES 2 616 961 T3

gatatogtga tgaccagtc ccacaagttc atgtccacct ccgtgggcca ccgggtgtcc 60
atctcctgca aggcctccca ggacgtgatc gccgccgtga cctggtatca gcagaagccc 120
ggccagtccc ccaagctgct gatctaactgg gcctccaccc ggcacaccgg cgtgccagac 180
agattcaccg gctccggcag cggcacogac tacaccctga ccctctccag catgcaggcc 240
gaggacctgg ccctgtacta ctgccagcag cactactcca cccctggac cttcggcgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa gcggaccgtg gccgctcct ccgtgttcat cttcccaccc 360
tcggacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caactctac 420
ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgcc tcgagtccgg caactcccag 480
gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtcctc caccctgacc 540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgct gcgaagtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 44
<211> 214
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5

<400> 44

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

10

ES 2 616 961 T3

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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> 45
 <211> 361
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 45

cgcgccgagg tccaactgca acagtctgga ccagaactgg tgatgcctgg ggcttcagtg 60
 aagatatacct gcaaggcttc tggctacagc ttcacaagct actatgtaca ctgggtgaag 120
 cagaggcctg gacagggact tgagtggatt ggatggattt atcctggaag tggtcatact 180
 aagtacaatg agaagttcaa ggacaaggcc aactgacgg cagacacatc ctccagcact 240
 gcctacatgc aactcagcag cctaacatct gaggactctg cggctctatta ctgtgcaaga 300
 cccccctact atagtaacta cgccgatgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcg 360
 a 361

5

10

ES 2 616 961 T3

<210> 46
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 46

Arg Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Met Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly His Thr Lys Tyr Asn Glu
 50 55 60

Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr Ala Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120

10 <210> 47
 <211> 678
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 47

ES 2 616 961 T3

ctagccgaca ttgtgatgac tcagtctcca tcctccctga ctgtgacagc aggagagaag	60
gtcactatga gctgcaagtc cagtcagagt ctgttaaaca gtggaaatca aaagaactac	120
ttgacctggt accagcagaa accagggcag cctcctaaac tgttgatcta ctgggcatcc	180
acaagggaat ctgggggcc tgatecgttc acaggcagtg gatctggaac agatttcact	240
ctcaccatca gcagtgtgca ggctgaagac ctggcagttt attactgtca gaggattat	300
agttatccgt acacgttcgg aggggggacc aagctggaaa taaaacgaac tgtggctgca	360
ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat gacagttga aatctggaac tgcctctgtt	420
gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac	480
gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc	540
tacagcctca gcagcacctt gacgctgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac	600
gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca caaagagctt caacagggga	660
gagtgtaat aagcggcc	678

<210> 48
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 48

ES 2 616 961 T3

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

<210> 49
 <211> 364
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

ES 2 616 961 T3

<400> 49

```

cgcgccgagg tgaagctggt tgagtcagga cctggcctcg tgaaaccttc tcagtctctg      60
tctctcacct gctctgtcac tggctactcc atcaccagtg gtttttactg gacctggatc      120
cggcagtttc caggcaacaa attggaatgg atgggcttca taagctacga tggtagcaat      180
aactacaacc catctctcaa aaatogaatc tccatcactc gtgacacatc taagaaccag      240
tttttcctga agttgaattc tgtgactact gaggacacag ccacatatta ctgtgcaaga      300
ggcggagggt actatggtaa cctctttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc      360
tcga                                                                           364
    
```

5 <210> 50
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 50

```

Arg Ala Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 1           5           10           15

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
          20           25           30

Ser Gly Phe Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
          35           40           45

Glu Trp Met Gly Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro
 50           55           60

Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
65           70           75           80

Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
          85           90           95

Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Gly Asn Leu Phe Asp Tyr Trp
          100          105          110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
          115          120
    
```

15 <210> 51
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 51

ES 2 616 961 T3

ctagccgata ttgtgatgac tcaaactaca tctccctgt cgcctctct gggagacaga 60
 gtcaccatca gttgcaggcc aagtcaggac attagcaatt atgtaaactg gtttcagcag 120
 aaaccaggtg gaactgttaa gctcctgac ttccacacat caagattaca ctcaggagtc 180
 ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga acagattatt ctctcacat tagcacctg 240
 gaacaggaag atattgccat ttacttttgc caacagggta ttacgcttcc gtggacgttc 300
 ggtggcggca ccaagctgga aataaaacga actgtggctg caccatctgt ctctcatctc 360
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
 ttctatocca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 480
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600
 cagggcctga gctcgcctgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta ataagcggcc 660

<210> 52
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 52

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

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

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

Leu Ile Phe His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Leu
 65 70 75 80

10

ES 2 616 961 T3

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

Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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

5 <210> 53
<211> 358
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 53

cgcgccgagg tgcagctgaa ggagtcagga cctggcctcg tgaaccttc tcagtctctg 60
tctctcacct gctctgtcac cggctactcc atcaccagtg cttattactg gaactggatc 120
cggcagtttc caggaacaa agtggaatgg atgggctaca taggctacga tggtcgtaat 180
acctacaacc catctctcaa aaatcgaatc tccatcactc gtgacacatc taagaaccag 240
tttttctctga aattgaattc totgactact gaggacacag ccacatatta ttgttcaaga 300
gaggggggact acggttactc tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctctga 358

10
15 <210> 54
<211> 119
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 54

ES 2 616 961 T3

Arg Ala Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 1 5 10 15

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30

Ser Ala Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Val
 35 40 45

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Gly Tyr Asp Gly Arg Asn Thr Tyr Asn Pro
 50 55 60

Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65 70 75 80

Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ser Arg Glu Gly Asp Tyr Gly Tyr Ser Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 115

<210> 55
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 55

ctagccgata ttgtgatgac gcaagctaca tctcctctgt ctgcctctct gggagacaga 60

gtcaccgtca gttgcagggc aagtcaggac attaacaatt atttaaattg gtatcagcag 120

aagccagatg gaactgttaa actcctgatc tactacacat caagattaca gtcaggagtc 180

ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga atagattatt ctctcaccat tagcaacctg 240

gagcaggaag attttgtcac ttacttttgc caacagagtg aaacgcttcc gtggacgttc 300

ggtggaggca ccaagctgga gctgaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 480

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta ataagcggcc 660

10

<210> 56
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

ES 2 616 961 T3

<400> 56

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

5

<210> 57
 <211> 367
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

ES 2 616 961 T3

<400> 57

```

cgcgccgagg tgcagctgca gcagtctgga cctgaactgg taaagcctgg ggcttcagtg      60
aagatgtcct gcaaggcttc tggatacaca ttcactagct atcttttgca ctgggtgaag      120
cagaagcctg ggcagggcct tgagtggatt ggatatatta atccttaca tgatgggtgct      180
aagtataatg agaagttgaa aggcaaggcc aactgactt cagacaaatc ctccagcaca      240
gcctacatgg aggtcagcag cctgacctct gaggactctg cggcttatta ctgtgcaaga      300
gaggggtgatt acgtgaggtg ctatgggtat gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc      360
gtctcga                                          367
    
```

5 <210> 58
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 58

```

Arg Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
 1              5              10              15

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20              25              30

Ser Tyr Leu Leu His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 35              40              45

Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Asn Glu
 50              55              60

Lys Leu Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 65              70              75              80

Ala Tyr Met Glu Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 85              90              95

Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Val Arg Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr
 100             105             110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 115             120
    
```

15 <210> 59
 <211> 675
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 59

ES 2 616 961 T3

```

ctagccgaca ttgtgctgac tcagtcgcca tcctctctgg ctgtgtctgc aggagaaaag      60
gtcactatga gctgtaagtc cagtcaaagt gttttataca tttcaaata gaaggaattac      120
ttggcctggc accagcagaa accagggcag tctcctaaac tactgatcta ctgggcatcc      180
actaggaaat ctggtgtccc tgatcgcttc acaggcagtg gatctgggac agattttact      240
cttaccatca gcagtgtaaa agctgaagac ctggcagttt attactgtca tcaaacacctc      300
tcctcgtaca cgttcggagg ggggaccaag ctggaaatca aacgaactgt ggctgcacca      360
tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg      420
tgctgtctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaggtt ggataacgcc      480
ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac      540
agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc      600
tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag      660
tgtaataaag cggcc                                          675

```

<210> 60
<211> 221
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5

<400> 60

ES 2 616 961 T3

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

<210> 61
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 61

ES 2 616 961 T3

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
 1 5

5
 <210> 62
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 62

Ile Tyr Pro Gly Ser Arg Ser Thr
 1 5

10
 <210> 63
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 63

Cys Thr Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Val Ser Ser Gly Asp Ala Met Asp
 1 5 10 15

Tyr Trp

20
 <210> 64
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 64

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His Trp
 1 5

30
 <210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 65

Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Asn
 1 5

40
 <210> 66
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 66

Cys Val Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp
 1 5 10

45
 <210> 67
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 67

ES 2 616 961 T3

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

5
<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 68

Ile Ser Gly Val Gly Ser Thr
1 5

10
15
<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 69

Cys Ala Arg Gly Ser Asp Gly Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

20
25
1 5 10 15
<210> 70
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 70

Gly Phe Ala Tyr Ser Thr Tyr Asp
1 5

30
35
<210> 71
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 71

Ile Ser Ser Gly Gly Asp Ala Ala
1 5

40
45
<210> 72
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 72

Cys Ala Arg Ser Arg Tyr Gly Asn Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp
1 5 10 15

50
<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 73

ES 2 616 961 T3

Gly Phe Ala Phe Ser Tyr Ser Asp
1 5

5
<210> 74
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 74

Met Ser Ser Ala Gly Asp Val Thr
1 5

10

15
<210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 75

Cys Val Arg His Arg Asp Val Ala Met Asp Tyr Trp
1 5 10

20

25
<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 76

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

30

35
<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 77

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr
1 5

40

<210> 78
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 78

Cys Ala Arg Asp Gly Gly Leu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp
1 5 10 15

45

50
<210> 79
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 79

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

55
<210> 80

ES 2 616 961 T3

<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5 <400> 80

Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr
1 5

10 <210> 81
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15 <400> 81

Cys Val Pro Gly Gly Leu Arg Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp
1 5 10

20 <210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 82

25 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His Trp
1 5

30 <210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 83

35 Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr
1 5

40 <210> 84
<211> 14
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 84

Cys Ala Arg Ala Tyr Tyr Asp Phe Ser Trp Phe Val Tyr Trp
1 5 10

45 <210> 85
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

50 <400> 85

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Trp
1 5

55 <210> 86
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

ES 2 616 961 T3

<400> 86

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr
1 5

5

<210> 87
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10

<400> 87

Ala Arg Trp Gly Asp Gly Ser Phe Ala Tyr
1 5 10

15

<210> 88
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20

<400> 88

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

25

<210> 89
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

30

<400> 89

Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr
1 5

35

<210> 90
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 90

40

Cys Ala Arg Lys Gly Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Lys Leu Ala Tyr Trp
1 5 10 15

45

<210> 91
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 91

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile Phe
1 5

50

<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

55

<400> 92

ES 2 616 961 T3

Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Pro
1 5

5 <210> 93
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 93

Cys Ala Gly Gly Pro Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp
1 5 10

10

15 <210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 94

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr
1 5

20

25 <210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 95

Ile Tyr Pro Gly Ser Gly His Thr
1 5

30 <210> 96
<211> 14
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

35 <400> 96

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr Ala Asp Val Trp
1 5 10

40 <210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

45 <400> 97

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr
1 5

50 <210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 98

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn
1 5

55

ES 2 616 961 T3

<210> 99
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5
 <400> 99

 Cys Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Gly Asn Leu Phe Asp Tyr Trp
 1 5 10 15

 10 <210> 100
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 15 <400> 100

 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala Tyr Tyr
 1 5

 20 <210> 101
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 25 <400> 101

 Ile Gly Tyr Asp Gly Arg Asn
 1 5

 30 <210> 102
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 102

 Cys Ser Arg Glu Gly Asp Tyr Gly Tyr Ser Asp Tyr Trp
 1 5 10

 35 <210> 103
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 103

 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Leu
 1 5

 45 <210> 104
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 50 <400> 104

 Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ala
 1 5

 55 <210> 105
 <211> 16
 <212> PRT

ES 2 616 961 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 105

5 Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Val Arg Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
1 5 10 15

<210> 106

<211> 6

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 106

Gln Asp Ile Gly Asn Tyr
1 5

15

<210> 107

<211> 3

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

20

<400> 107

Tyr Thr Ser
1

25

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30

<400> 108

Cys Gln His Tyr Asn Thr Val Pro Pro Thr Phe
1 5 10

35

<210> 109

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 109

40

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr
1 5 10

45

<210> 110

<211> 3

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 110

50

Gln Met Ser
1

55

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 111

ES 2 616 961 T3

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe
 1 5 10

5
 <210> 112
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 112

Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Phe
 1 5 10

10
 <210> 113
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 113

Leu Ala Ser
 1

20
 <210> 114
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 114

Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe
 1 5 10

30
 <210> 115
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 115

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

40
 <210> 116
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 116

Lys Val Ser
 1

50
 <210> 117
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 117

ES 2 616 961 T3

		Cys	Ser	Gln	Asn	Thr	His	Val	Tyr	Thr	Phe	
		1				5					10	
5	<210>	118										
	<211>	11										
	<212>	PRT										
	<213>	<i>Mus musculus</i>										
	<400>	118										
10		Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr
		1				5					10	
15	<210>	119										
	<211>	3										
	<212>	PRT										
	<213>	<i>Mus musculus</i>										
	<400>	119										
20						Lys	Val	Ser				
						1						
25	<210>	120										
	<211>	10										
	<212>	PRT										
	<213>	<i>Mus musculus</i>										
	<400>	120										
30		Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Thr	Phe	
		1				5					10	
35	<210>	121										
	<211>	6										
	<212>	PRT										
	<213>	<i>Mus musculus</i>										
	<400>	121										
40		Gln	Asp	Val	Asp	Thr	Ala					
		1				5						
45	<210>	122										
	<211>	3										
	<212>	PRT										
	<213>	<i>Mus musculus</i>										
	<400>	122										
50						Trp	Ala	Ser				
						1						
55	<210>	123										
	<211>	11										
	<212>	PRT										
	<213>	<i>Mus musculus</i>										
	<400>	123										
55		Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe
		1				5					10	

ES 2 616 961 T3

<210> 124
<211> 6
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5

<400> 124

Gln Asp Val Ser Ala Ala
1 5

10

<210> 125
<211> 3
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15

<400> 125

Trp Ala Ser
1

20

<210> 126
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

25

<400> 126

Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe
1 5 10

30

<210> 127
<211> 6
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 127

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

35

<210> 128
<211> 3
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

40

<400> 128

Tyr Ile Ser
1

45

<210> 129
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

50

<400> 129

Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu Thr Phe
1 5 10

55

<210> 130
<211> 6
<212> PRT

ES 2 616 961 T3

<213> *Mus musculus*
<400> 130

Gln Asn Val Gly Thr Ala
1 5

5

<210> 131
<211> 3
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10

<400> 131

Ser Thr Ser
1

15

<210> 132
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20

<400> 132

Cys Gln Gln Tyr Arg Ser Tyr Pro Phe Thr Phe

1

5

10

25

<210> 133
<211> 6
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

30

<400> 133

Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
1 5

35

<210> 134
<211> 3
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 134

40

Ala Ala Thr
1

45

<210> 135
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 135

Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp Thr Phe
1 5 10

50

<210> 136
<211> 6
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

ES 2 616 961 T3

<400> 136

Gln Asp Val Ile Ala Ala
1 5

5

<210> 137
<211> 3
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10

<400> 137

Trp Ala Ser
1

15

<210> 138
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20

<400> 138

Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe
1 5 10

25

<210> 139
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

30

<400> 139

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

35

<210> 140
<211> 3
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 140

40

Trp Ala Ser
1

45

<210> 141
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 141

50

Cys Gln Ser Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe
1 5 10

55

<210> 142
<211> 6
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 142

ES 2 616 961 T3

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

5 <210> 143
<211> 3
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 143

His Thr Ser
1

10

15 <210> 144
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 144

Cys Gln Gln Gly Ile Thr Leu Pro Trp Thr Phe
1 5 10

20

25 <210> 145
<211> 6
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 145

Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
1 5

30 <210> 146
<211> 3
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

35 <400> 146

Tyr Thr Ser
1

40 <210> 147
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 147

Cys Gln Gln Ser Glu Thr Leu Pro Trp Thr Phe
1 5 10

45

50 <210> 148
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 148

Gln Ser Val Leu Tyr Ile Ser Asn Glu Arg Asn Tyr
1 5 10

55

ES 2 616 961 T3

5 <210> 149
<211> 3
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 149

Trp Ala Ser
1

10 <210> 150
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15 <400> 150

Cys His Gln His Leu Ser Ser Tyr Thr Phe
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica de anticuerpo que comprende:

- 5 a) una primera molécula de anticuerpo anti-EGFR que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 73-75, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 118-120, respectivamente y una segunda molécula de anticuerpo anti-EGFR que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 76-78, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 121-123, respectivamente;
- 10 b) una primera molécula de anticuerpo anti-HER2 que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 82-84, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 127-129, respectivamente y una segunda molécula de anticuerpo anti-HER2 que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 88-90, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 133-135, respectivamente y
- 15 c) una primera molécula de anticuerpo anti-HER que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 97-99, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 142-144, respectivamente, y una segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 100-102, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 145-147, respectivamente.

2. La composición de anticuerpo de la reivindicación 1, en la que:

- 25 a) la primera molécula de anticuerpo anti-EGFR comprende las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO: 18 y 20, respectivamente, y la segunda molécula de anticuerpo anti-EGFR comprende las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO: 22 y 24, respectivamente;
- 30 b) la primera molécula de anticuerpo anti-HER2 comprende las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO: 30 y 32, respectivamente, y la segunda molécula de anticuerpo anti-HER2 comprende las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO: 38 y 40, respectivamente; y
- 35 c) la primera molécula de anticuerpo anti-HER3 comprende las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO: 50 y 52, respectivamente, y la segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 comprende las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO: 54 y 56, respectivamente.

3. La composición de anticuerpo de la reivindicación 2, en la que:

- 40 la primera molécula de anticuerpo anti-EGFR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; la segunda molécula de anticuerpo anti-EGFR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; la primera molécula de anticuerpo anti-HER2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32; la segunda molécula de anticuerpo anti-HER2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; la primera molécula de anticuerpo anti-HER3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y
- 45 la segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

4. La composición de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la cadena pesada de cada molécula de anticuerpo comprende una región constante de IgG₁ o IgG₂.

50 5. La composición de anticuerpo de la reivindicación 3, en la que la cadena pesada de cada molécula de anticuerpo comprende una región constante de IgG₁.

6. La composición de anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en la que al menos una de dichas moléculas de anticuerpo es:

- 55 a) un anticuerpo quimérico con dominios variables no humanos y regiones constantes humanas o
b) un anticuerpo humanizado.

60 7. La composición de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que al menos una de dichas moléculas de anticuerpo es un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con un agente contra el cáncer.

65 8. Un método para la producción de la composición de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende proporcionar células hospedadoras capaces de expresar una molécula de anticuerpo de la composición, cultivar dichas células hospedadoras en condiciones adecuadas para la expresión de las moléculas de anticuerpo y aislar las moléculas de anticuerpo resultantes.

9. El método de la reivindicación 8, en el que las células hospedadoras se cultivan en un único biorreactor.

10. Una composición farmacéutica que comprende la composición de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

11. La composición de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso como un medicamento.

12. La composición de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición farmacéutica de la reivindicación 10 para su uso seleccionado del grupo que consiste en:

10

a) uso en el tratamiento del cáncer;

b) uso en el tratamiento de un trastorno caracterizado por la dependencia de HER y

c) uso en el tratamiento del cáncer en un ser humano u otro mamífero que ha adquirido resistencia al tratamiento con un anticuerpo anti-HER o a un inhibidor de la tirosina quinasa.

15

13. Un artículo farmacéutico que comprende la composición de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o la composición farmacéutica de la reivindicación 10, y al menos un compuesto quimioterapéutico o antineoplásico, como una combinación para la administración simultánea, individual o sucesiva en el tratamiento del cáncer.

20

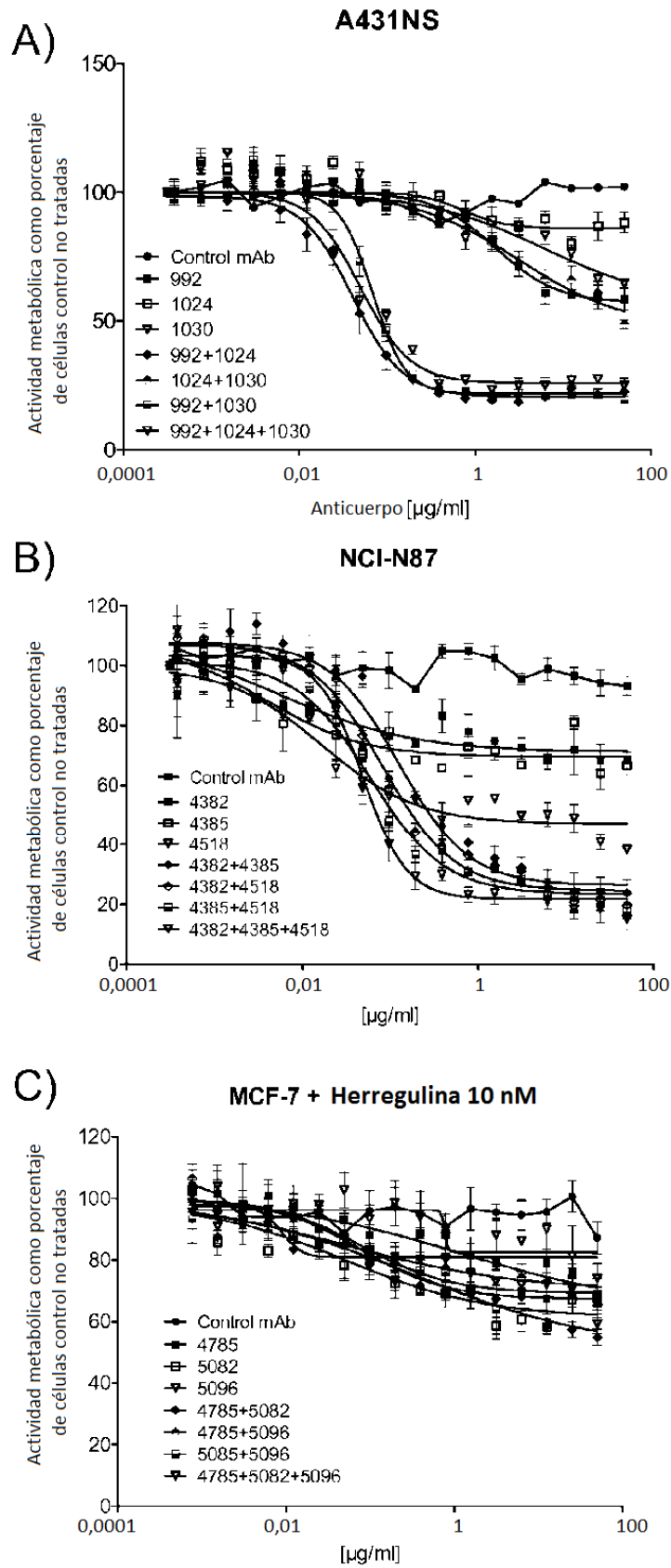


Fig. 1

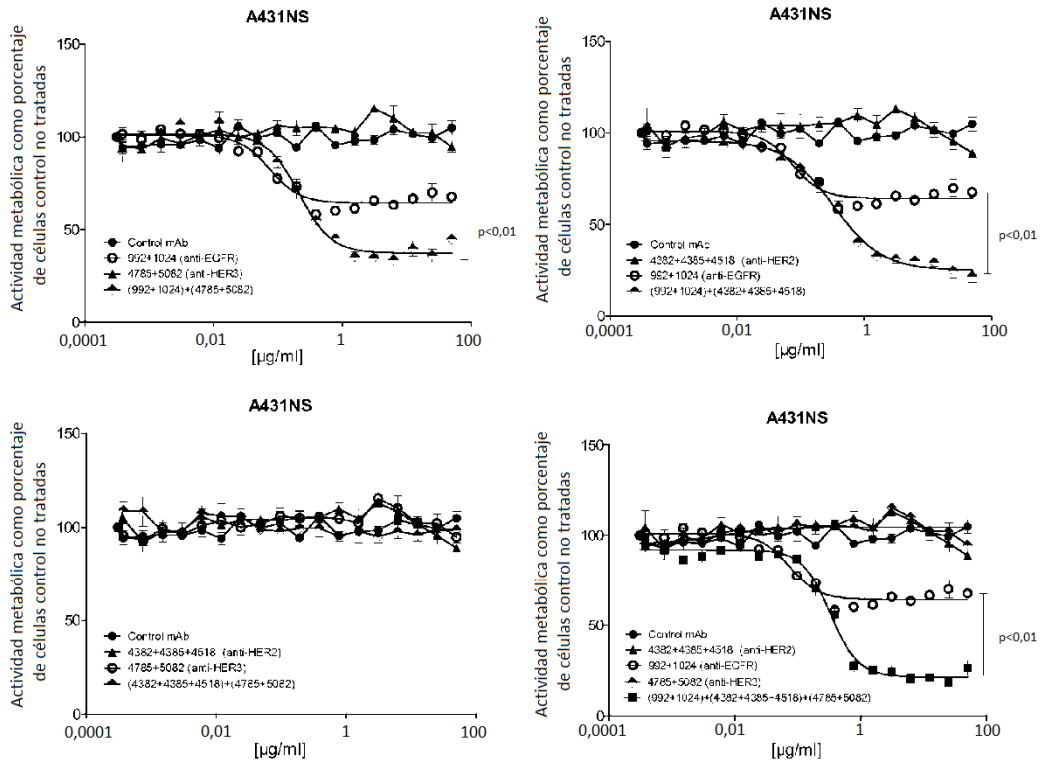


Fig. 2

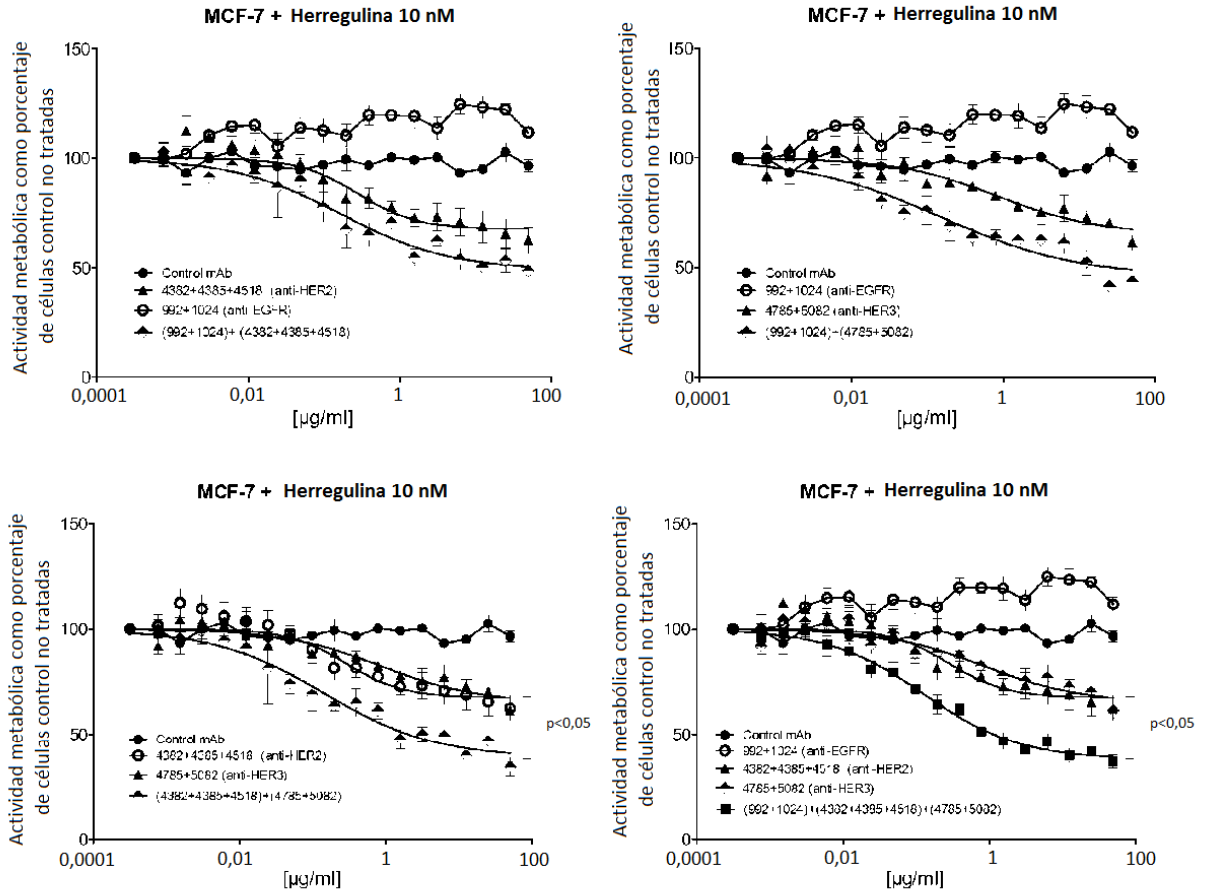


Fig. 3

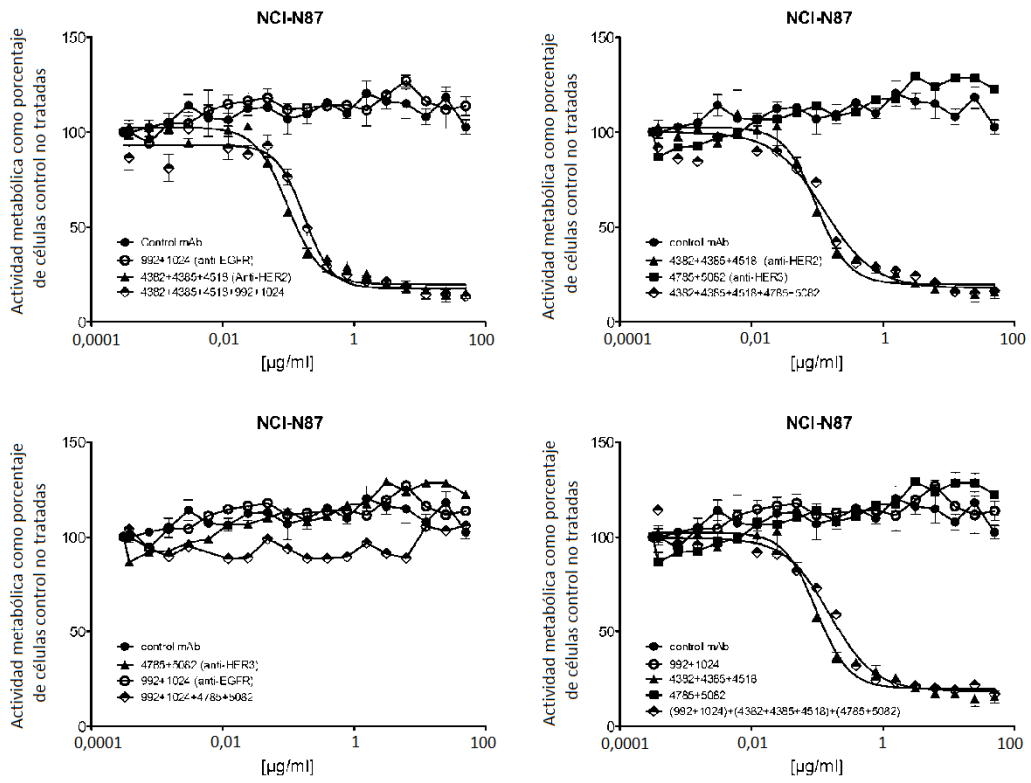


Fig. 4

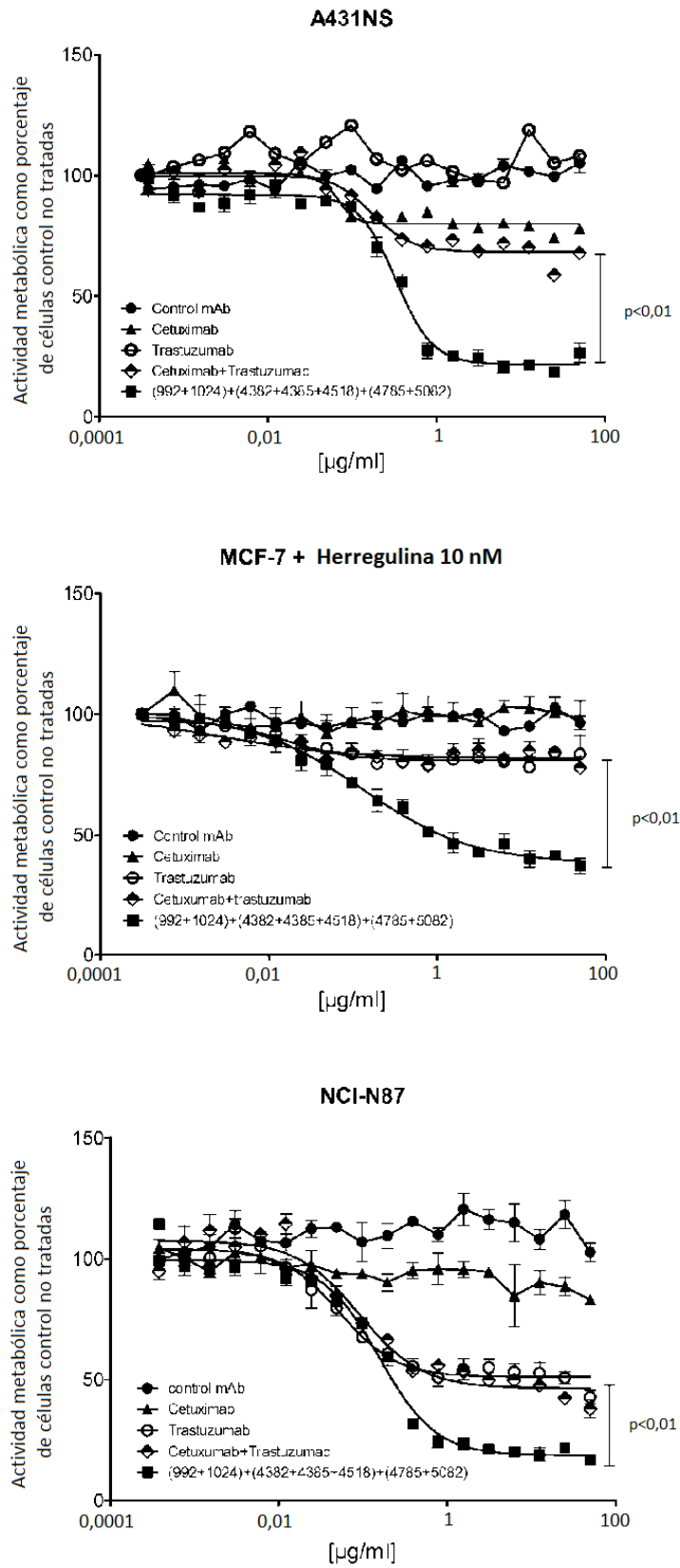


Fig. 5

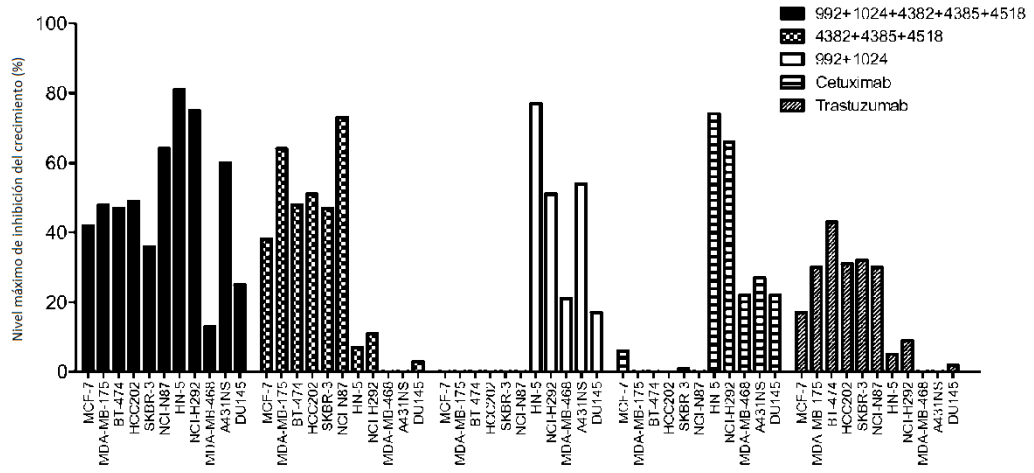


Fig. 6

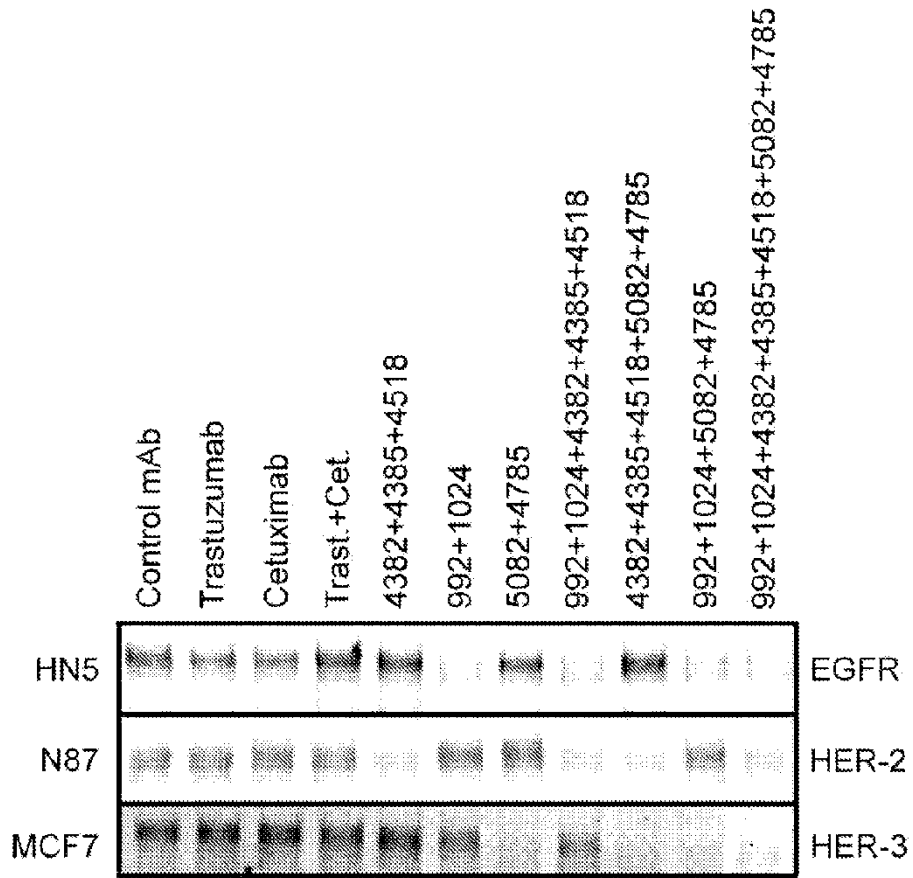


Fig. 7

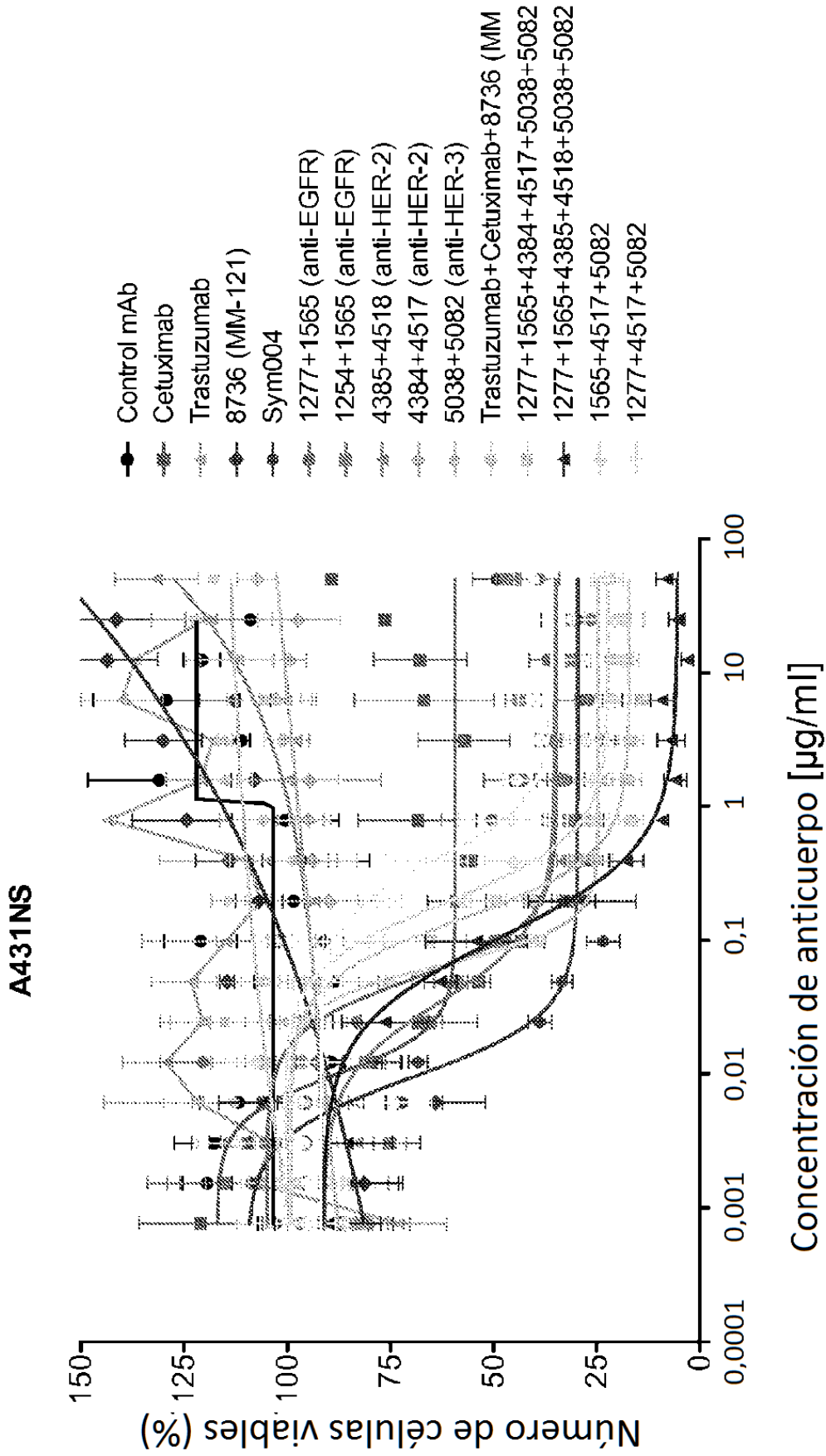


Fig. 8

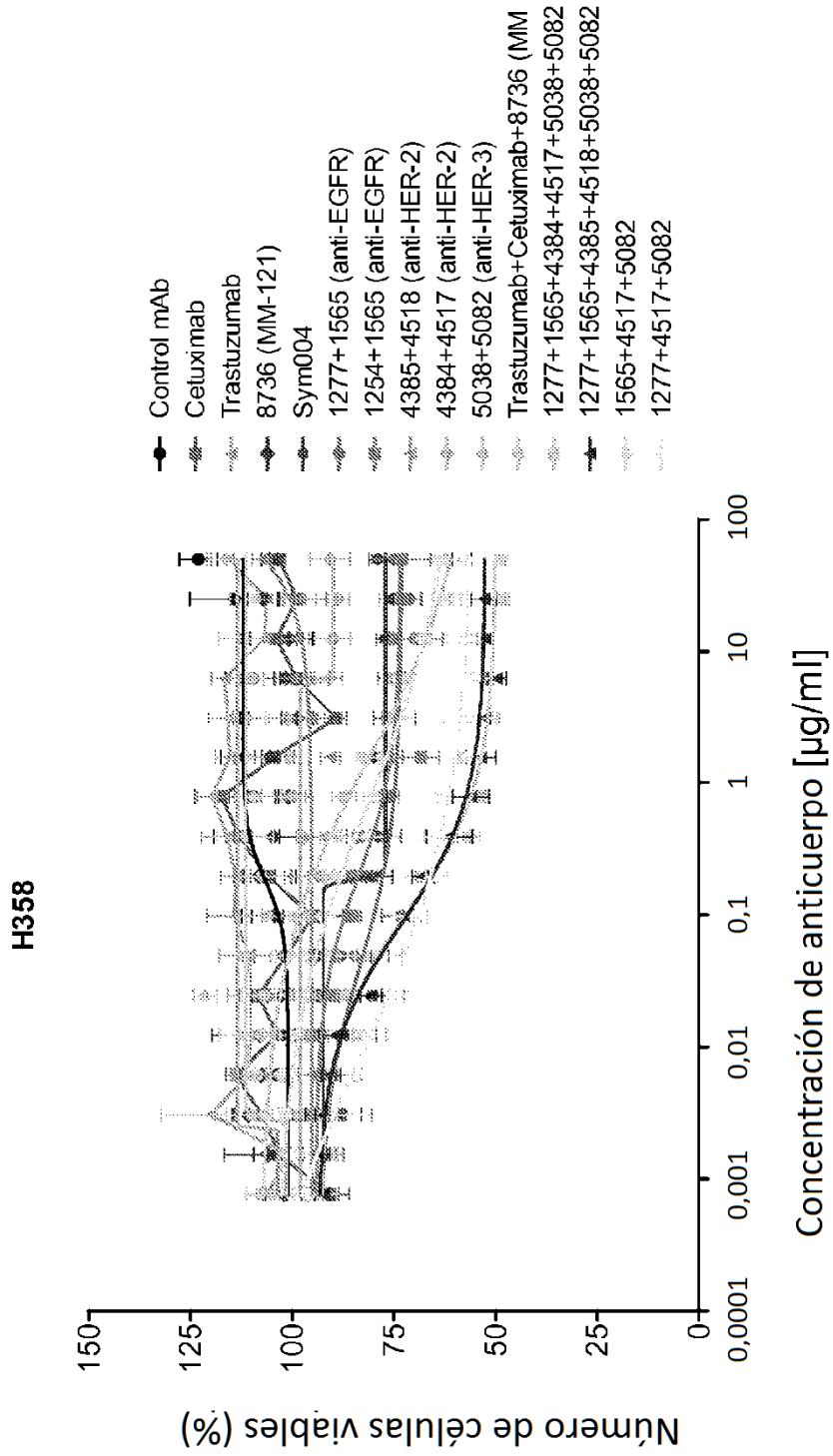
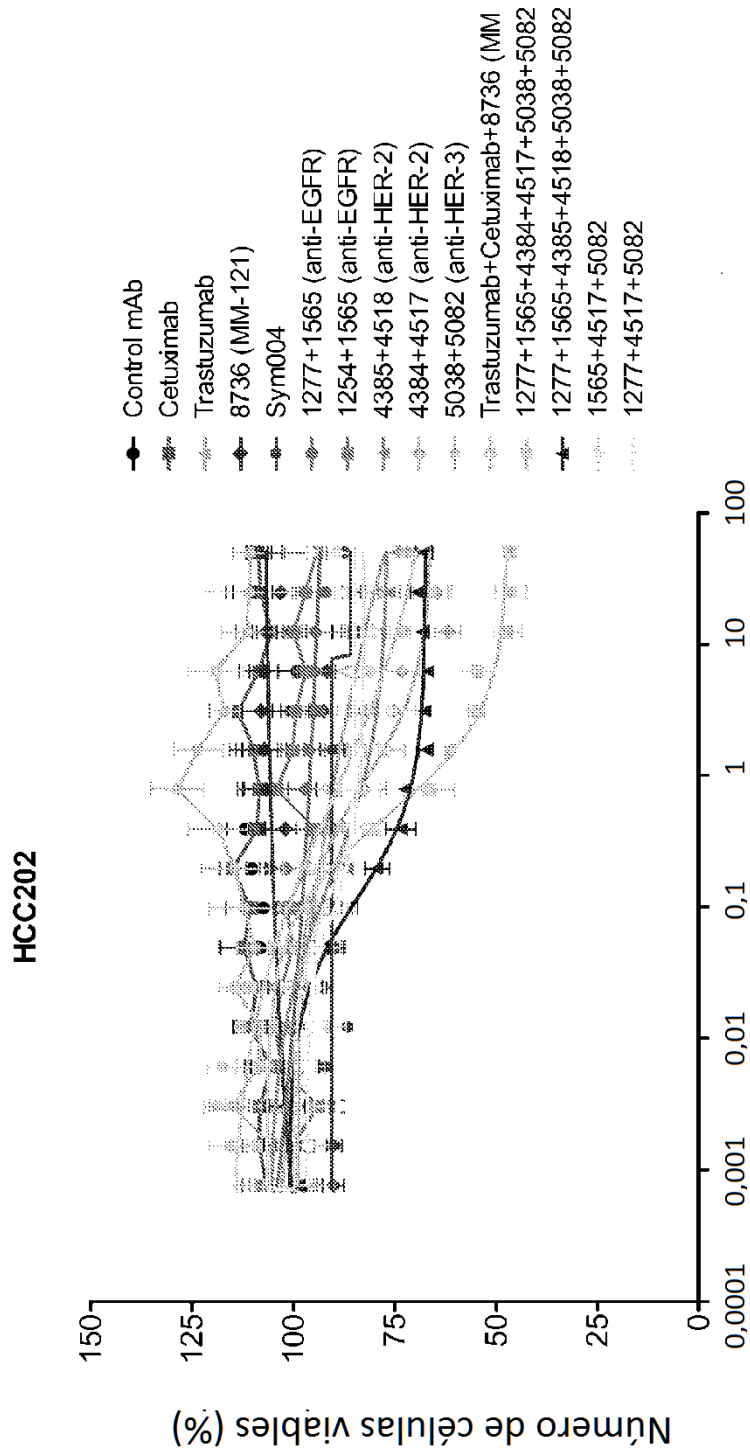


Fig. 9



Concentración de anticuerpo [µg/ml]
Fig. 10

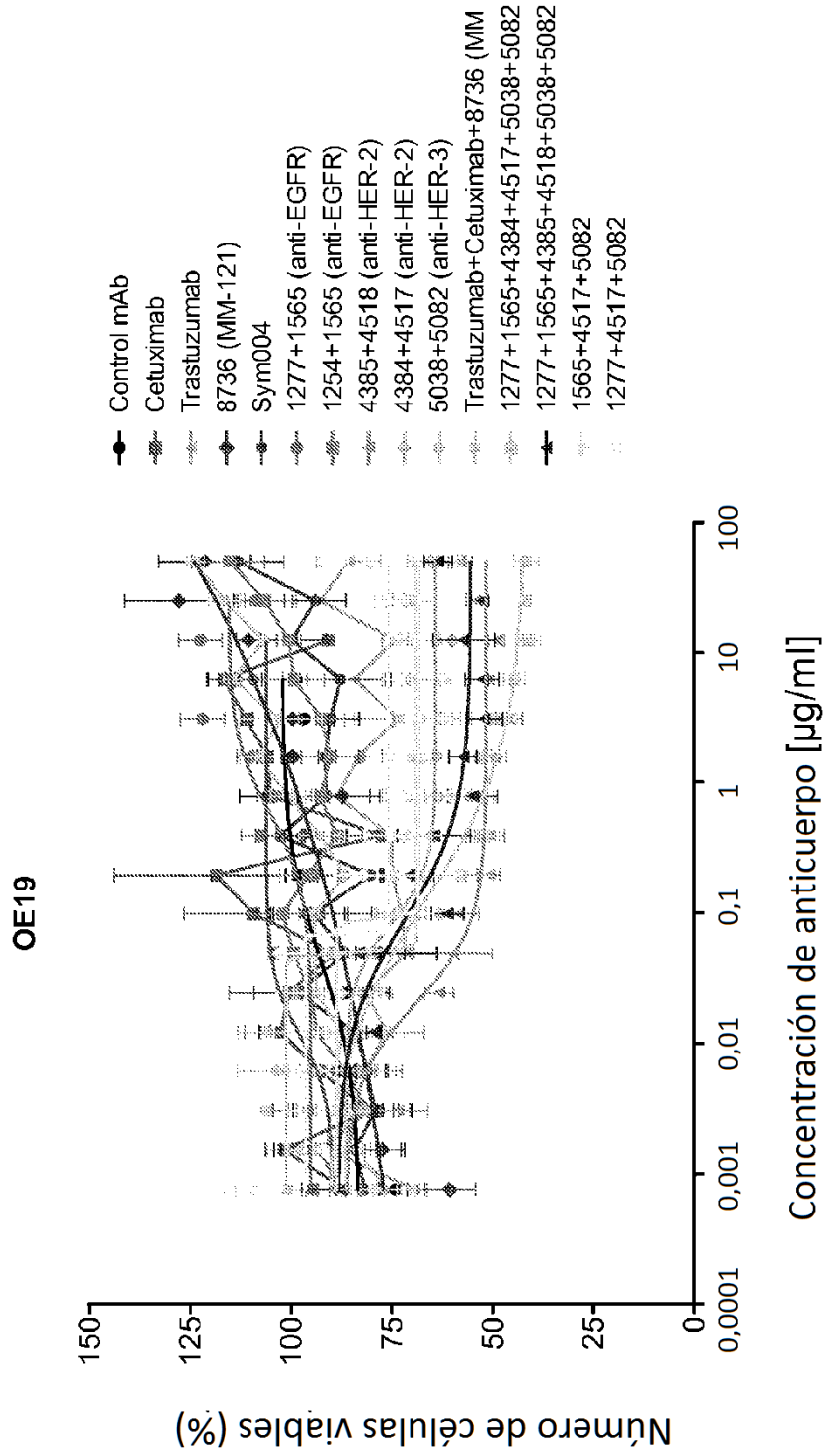


Fig. 11

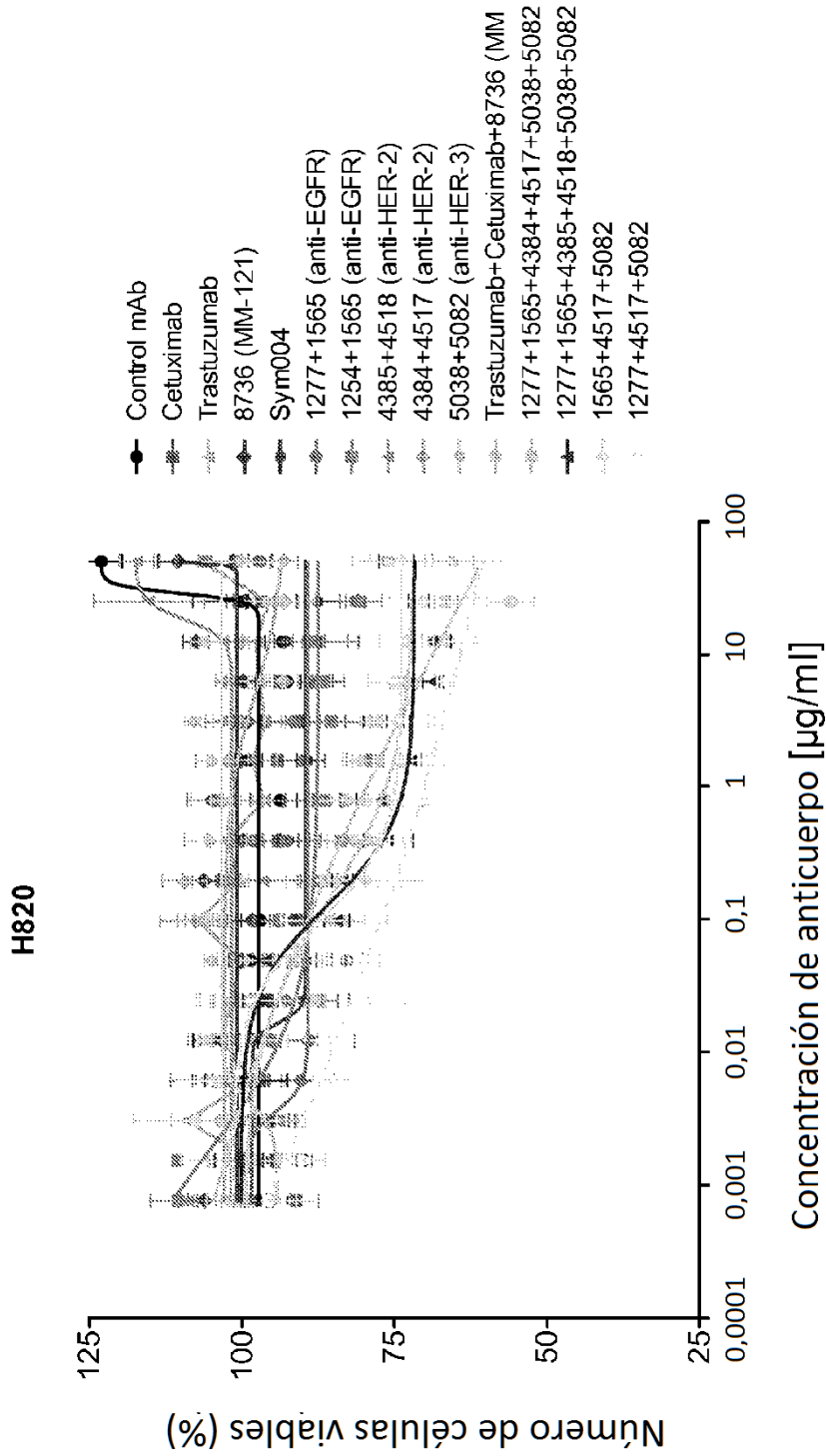


Fig. 12

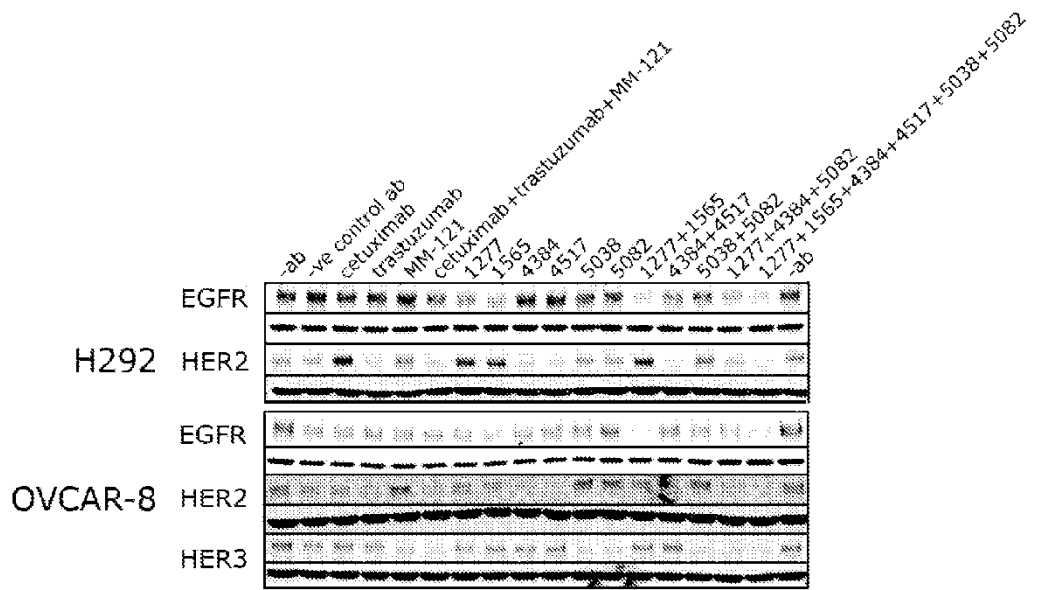


Fig. 13

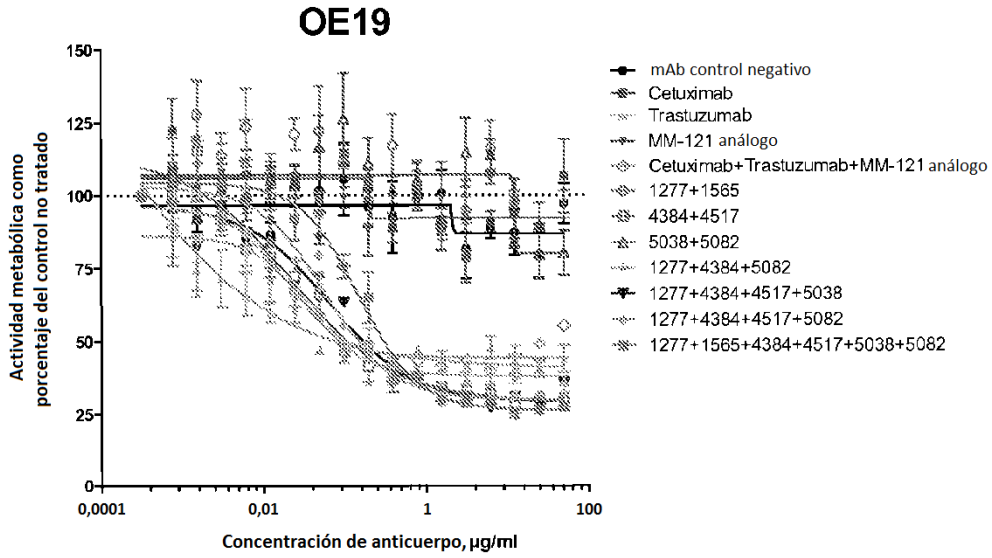


Fig. 14

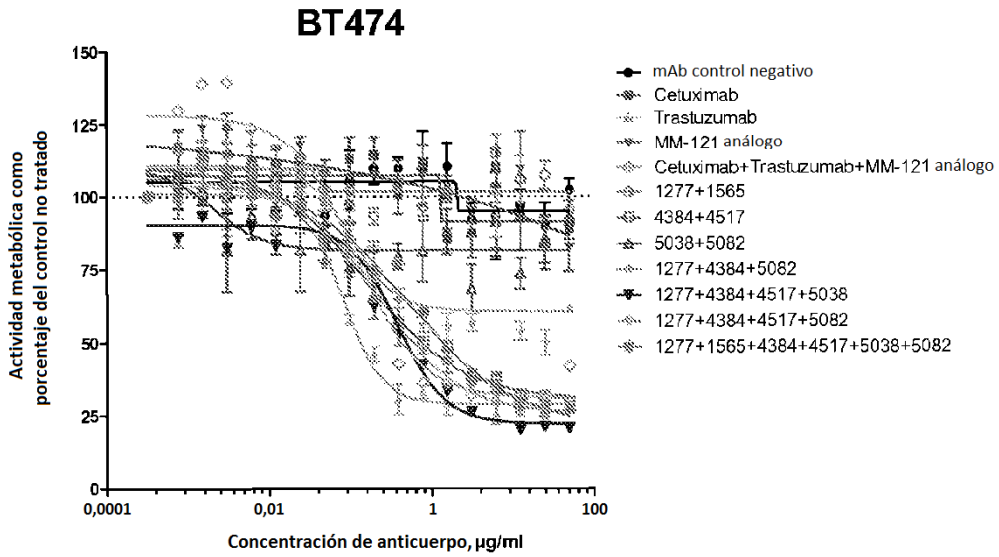


Fig. 15

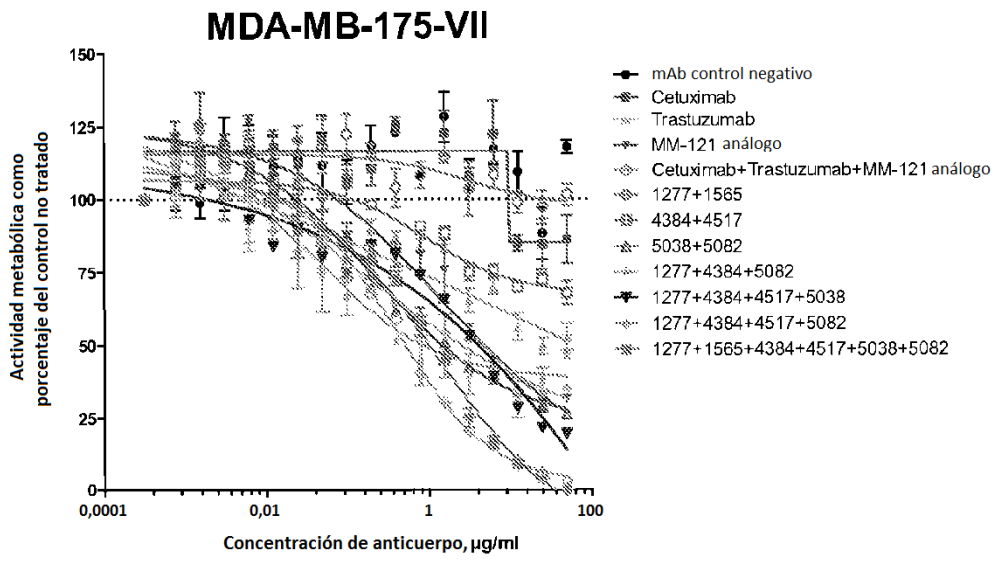


Fig. 16

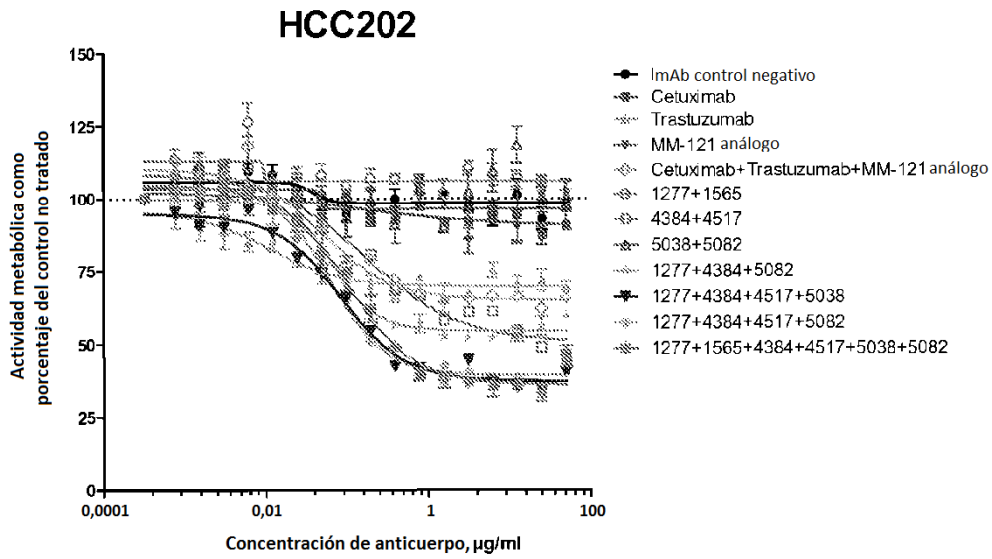
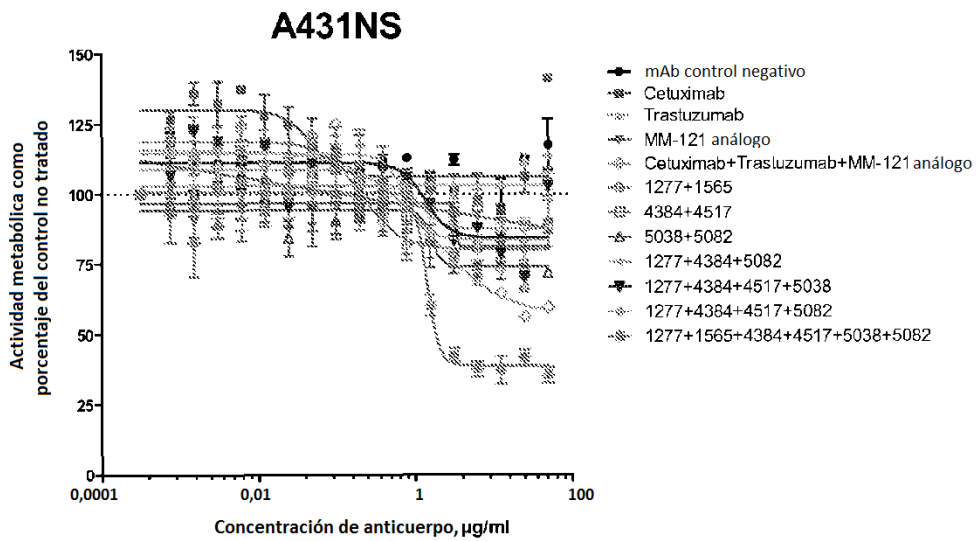
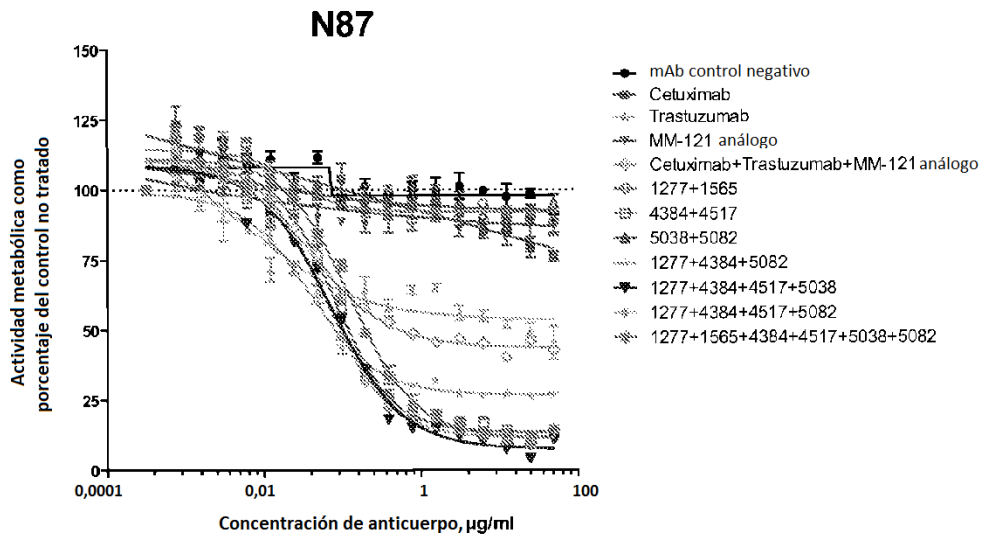


Fig. 17



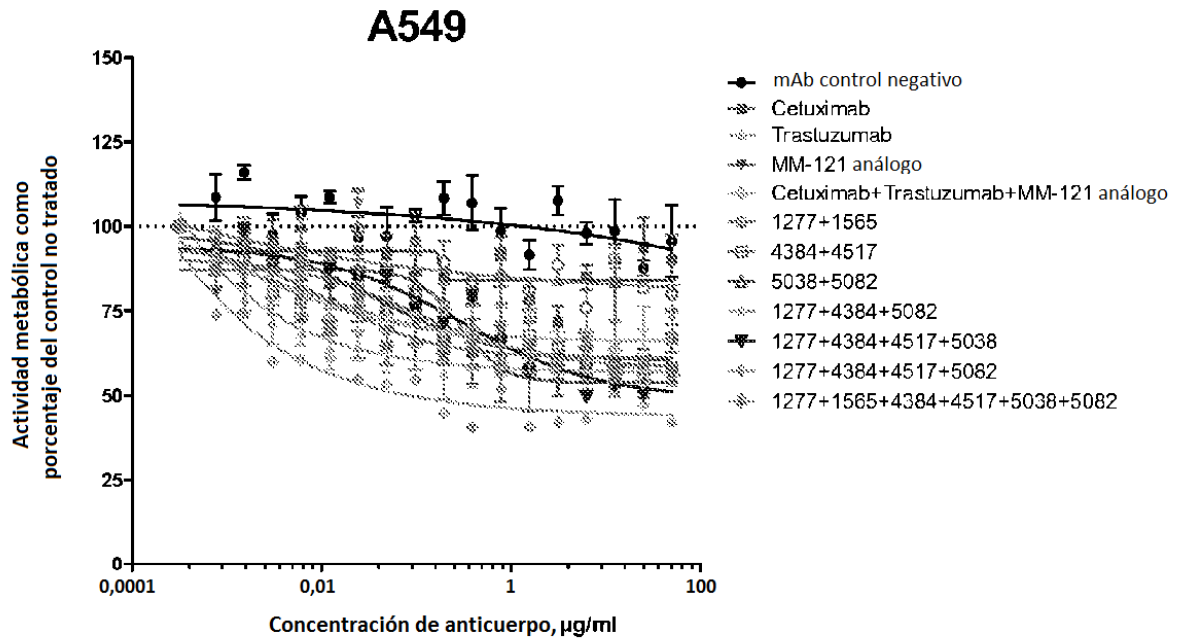


Fig. 20

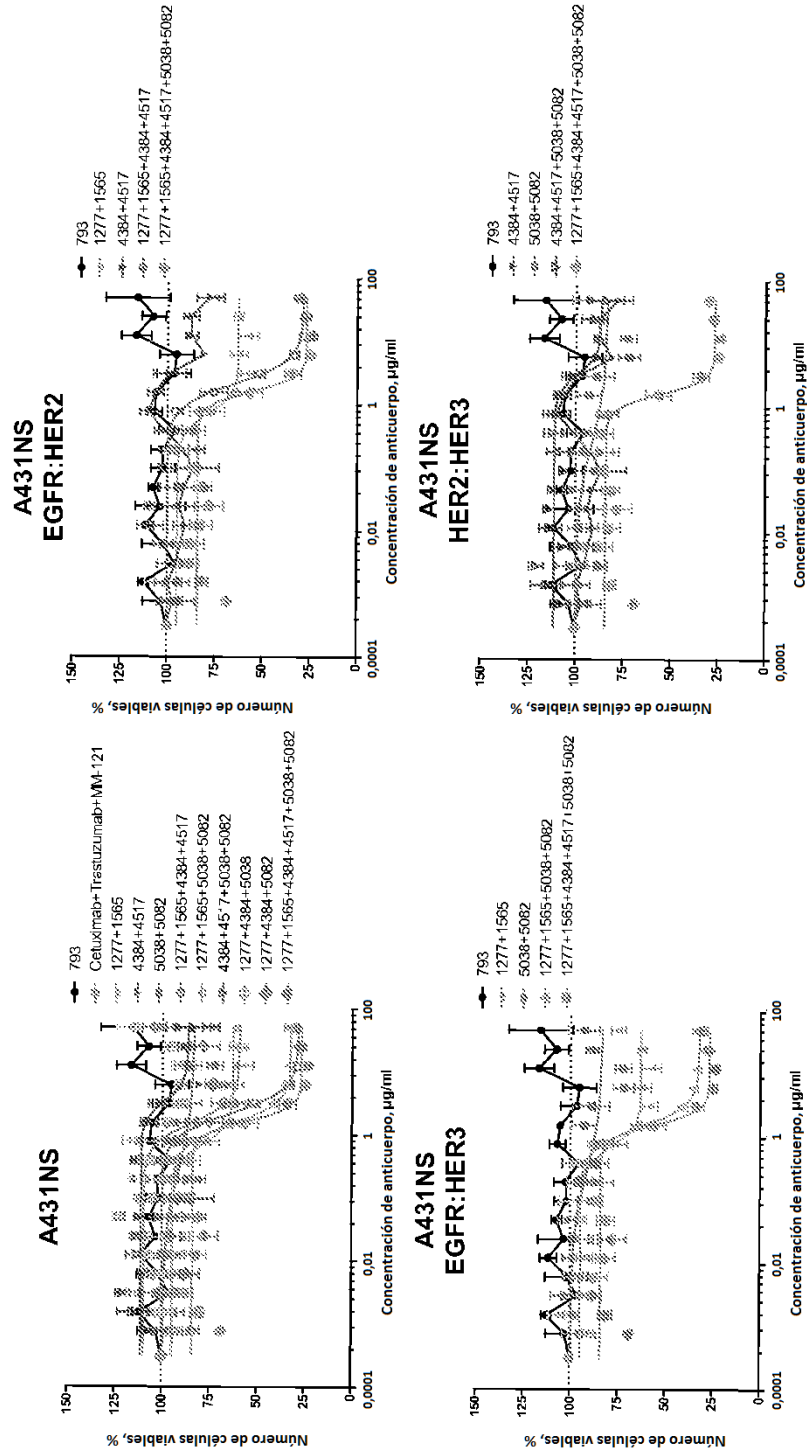


Fig 21

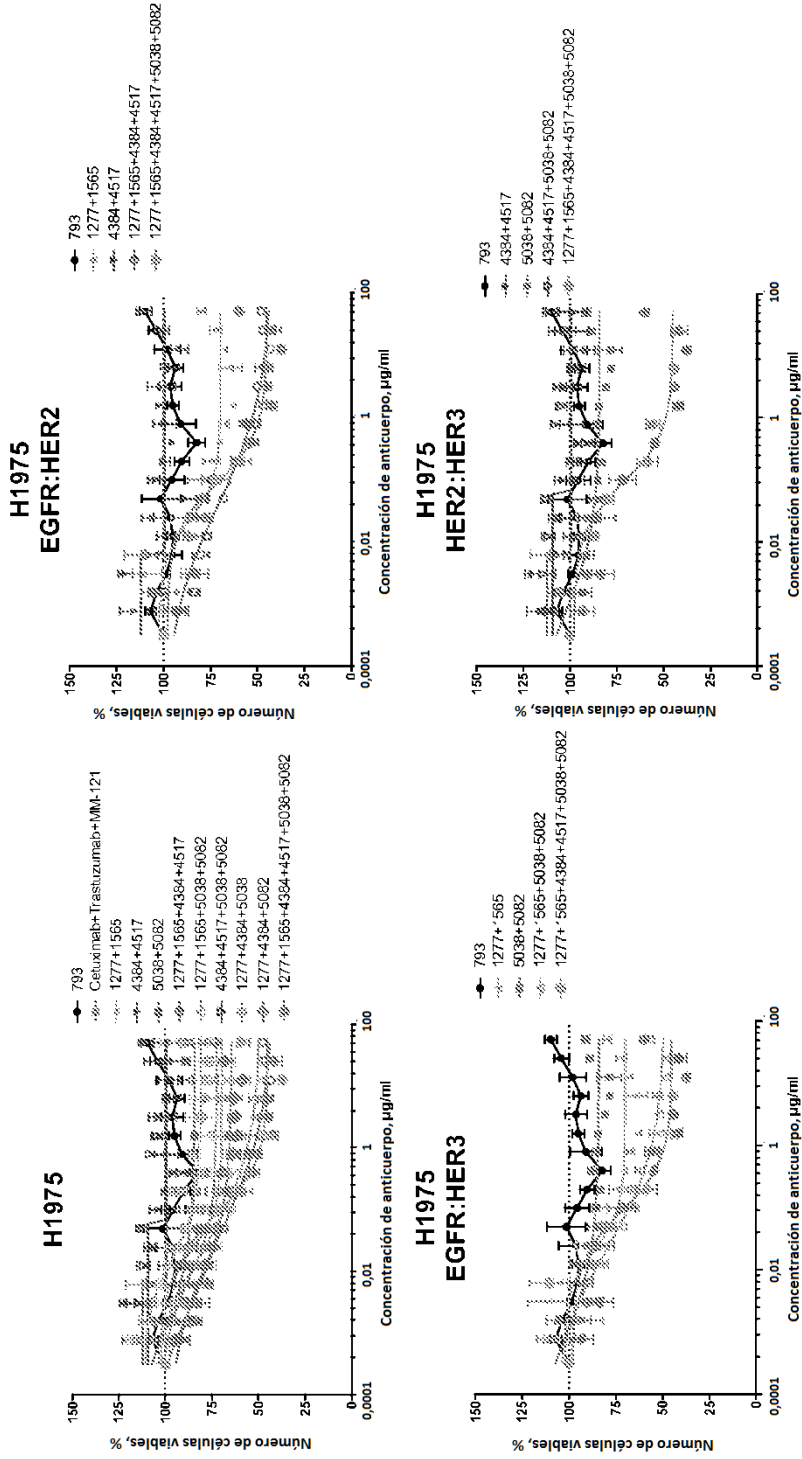


Fig. 22

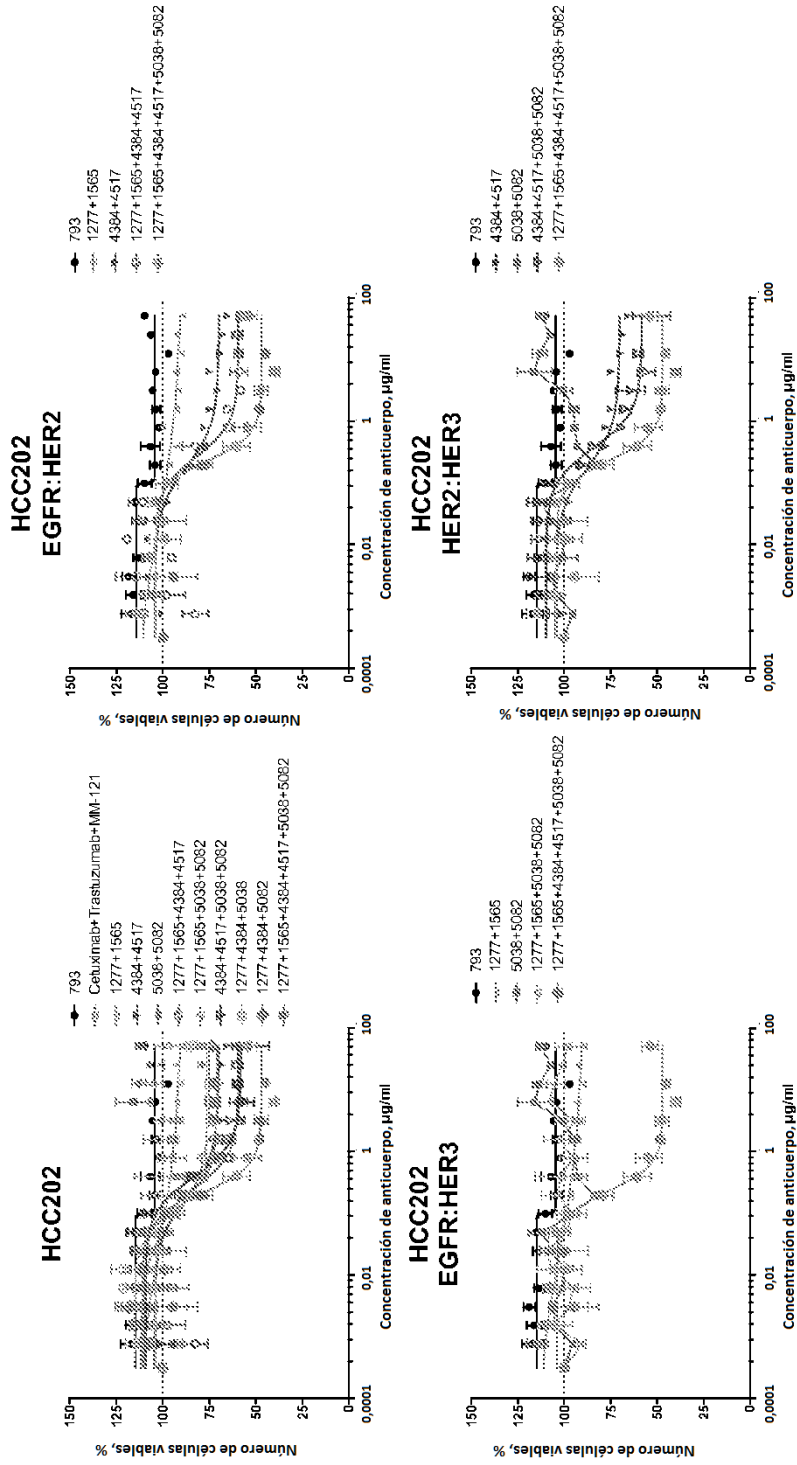


Fig. 23

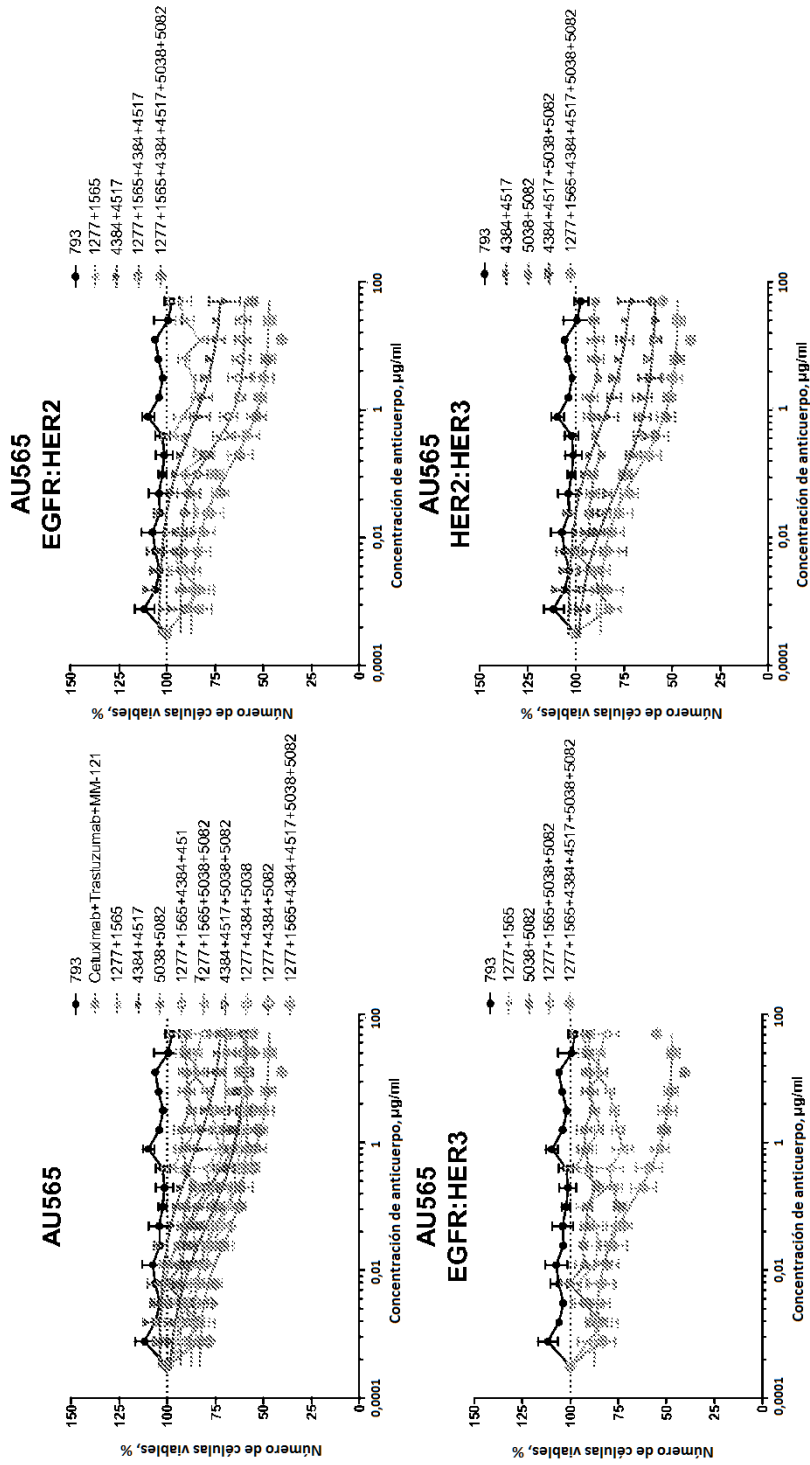


Fig. 24

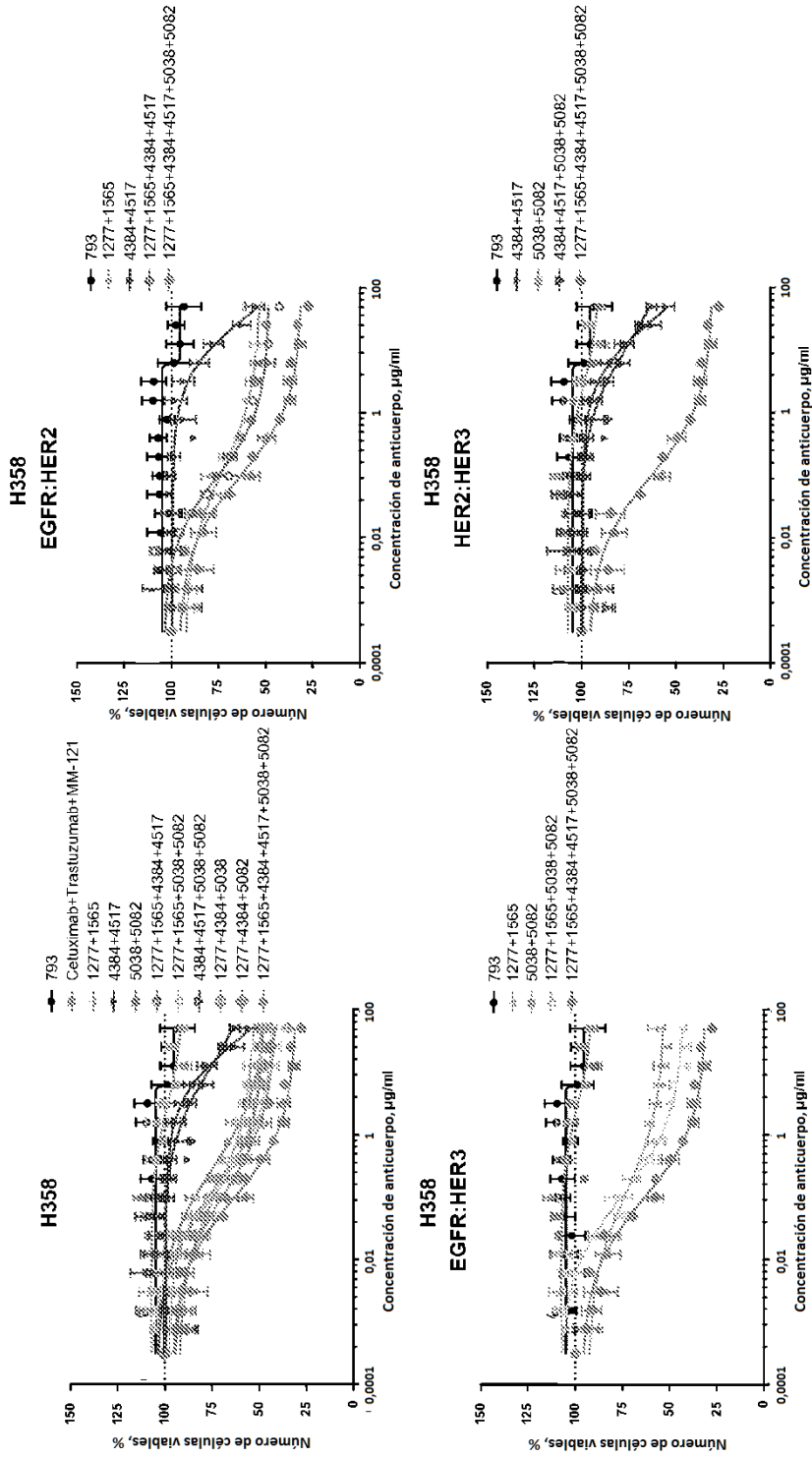


Fig. 25

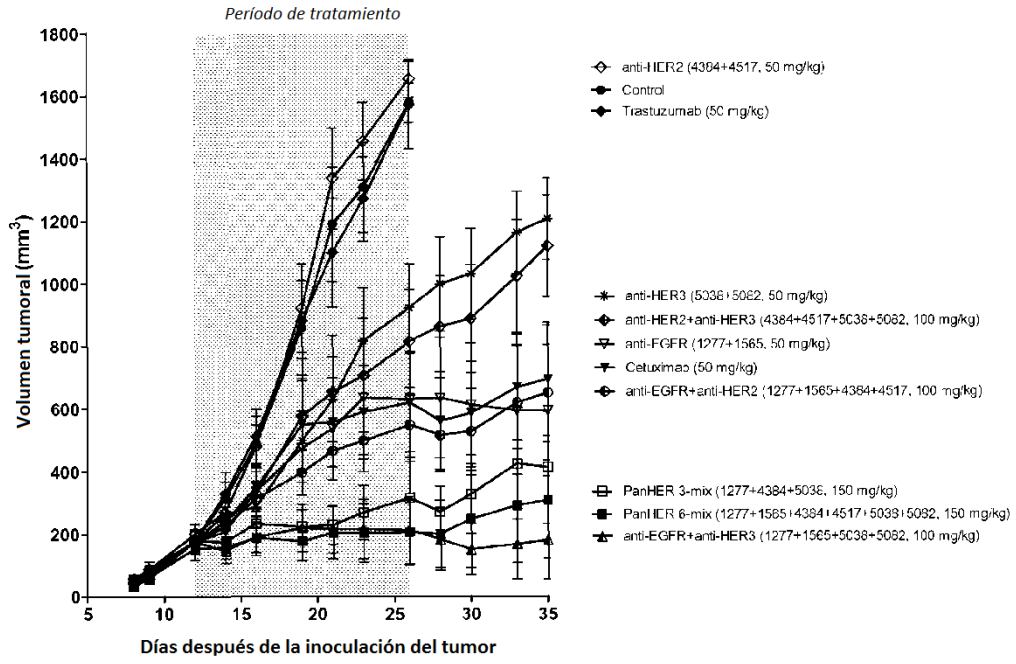


Fig. 26