

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 546**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2006 PCT/EP2006/012632**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2007 WO07077028**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2006 E 06841231 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 1984402**

54 Título: **Anticuerpos dirigidos a HER-3 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**30.12.2005 US 755103 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.07.2017**

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO EUROPE GMBH (50.0%)  
Zielstattstr. 48  
81379 München, DE y  
AMGEN INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ROTHE, MIKE;  
TREDER, MARTIN;  
HARTMANN, SUSANNE;  
FREEMAN, DAN;  
RADINSKY, BOB y  
BORGES, ERIC**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 621 546 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos dirigidos a HER-3 y usos de los mismos

### Antecedentes de la invención

#### 1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos y sus fragmentos de unión que se unen a HER-3 y a polinucleótidos que codifican los mismos. También se proporcionan vectores de expresión y células hospedadoras que comprenden los mismos para la producción del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la invención. Además, la invención proporciona composiciones y métodos para diagnosticar y tratar enfermedades asociadas con la transducción de señales mediada por HER-3 y/o su ligando heregulina.

#### 10 2. Antecedentes de la tecnología

El receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-3, también conocido como ErbB3) es una proteína tirosina cinasa receptora y pertenece a la subfamilia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de proteína tirosina cinasas receptoras, que también incluye HER-1 (también conocido como EGFR), HER-2 y HER-4 (Plowman y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (1990), 4905-4909; Kraus y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1989), 9193-9197; y Kraus y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993), 2900-2904). Como el receptor del factor de crecimiento epidérmico prototípico, el receptor transmembranario HER-3 consiste en un dominio de unión a ligando extracelular (ECD), un dominio de dimerización dentro del ECD, un dominio transmembranario, un dominio de proteína tirosina cinasa (TKD) intracelular y un dominio de fosforilación C-terminal.

20 El ligando heregulina (HRG) se une al dominio extracelular de HER-3 y activa la ruta de señalización mediada por receptor al promover la dimerización con otros miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humanos (HER) y la transfosforilación de su dominio intracelular. La formación de dímeros entre miembros de la familia de HER expande el potencial de señalización de HER-3 y es un medio no solo para la diversificación de señales sino también la amplificación de señales. Por ejemplo, el heterodímero HER-2/HER-3 induce una de las señales mitogénicas más importantes entre los miembros de la familia de HER.

Se ha encontrado que HER-3 se sobreexpresa en varios tipos de cáncer tales como cáncer de mama, gastrointestinal y pancreático. De forma interesante, se ha mostrado una correlación entre la expresión de HER-2/HER-3 y la progresión desde un estadio no invasivo a uno invasivo (Alimandi y cols., *Oncogene* 10, 1813-1821; deFazio y cols., *Cancer* 87, 487-498; Naidu y cols., *Br. J. Cancer* 78, 1385-1390). Según esto, son deseables agentes que interfieran con la señalización mediada por HER-3. Se han presentado anticuerpos para HER-3 murinos o quiméricos, tal como en los documentos US5968511, US5480968 y WO03013602. El documento US 2004/071696 divulga anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra el dominio extracelular de HER-3 y su uso para tratar el cáncer.

35 Se ha mostrado que un anticuerpo monoclonal humanizado contra HER-2, Herceptin<sup>®</sup>, interfiere con la señalización mediada por HER-2 y es terapéuticamente eficaz en seres humanos (Fendly y cols., *Hybridoma* 6, 359-370; Hudziak y cols., *Mol. Cell. Biol.* 9, 1165-1172; Stebbing y cols., *Cancer Treat. Rev.* 26, 287-290). Se ha mostrado que Herceptin<sup>®</sup> actúa a través de dos mecanismos diferentes, es decir, la asociación de las células efectoras del sistema inmunitario así como un efecto inductor de la apoptosis citotóxico directo.

40 Sin embargo, solo los pacientes con HER-2 muy amplificado responden significativamente a la terapia con Herceptin<sup>®</sup>, limitando así el número de pacientes adecuados para la terapia. Además, el desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la expresión o la secuencia epitópica de HER-2 sobre células tumorales pueden convertir incluso a los pacientes accesibles en no reactivos con el anticuerpo y de ese modo anular sus efectos terapéuticos. Por lo tanto, se necesitan más fármacos para terapias basadas en dianas que se enfoquen a miembros adicionales de la familia de HER, tales como HER-3.

### Breve descripción de las figuras de los dibujos

50 La Fig. 1 muestra el nivel de expresión de HER-3 en un grupo de líneas celulares cancerosas humanas y demuestra que HER-3 se expresa en una variedad de cánceres humanos.

La Fig. 2 muestra los resultados del análisis por FACS de un anticuerpo para HER-3 que se une bien a células Rat1 que expresan establemente los diferentes miembros de la familia de HER o bien solamente al vector vacío.

La Fig. 3 muestra compartimentos de unión a anticuerpo cartografiados para dominios de HER3.

La Fig. 4. muestra los resultados del análisis de afinidad de anticuerpos de Scatchard por FACS indirecta realizado con anticuerpos anti-HER-3 de la invención. El análisis indica que los anticuerpos anti-HER-3 de la invención poseen grandes afinidades y fuertes constantes de unión para HER-3 expresado sobre la superficie celular.

La Fig. 5 muestra la endocitosis acelerada de HER-3 inducida por anticuerpos anti-HER-3 de la invención.

- 5 Las Figs. 6a-e muestran los resultados de un ensayo de competición de ligandos realizado con anticuerpos anti-HER-3 de la invención. Los resultados demuestran que los anticuerpos de la invención reducen específicamente la unión de [<sup>125</sup>I]-α-HRG/[<sup>125</sup>I]-β-HRG a células que expresan HER-3 endógeno.

- 10 La Fig. 7a muestra los resultados de un ELISA de fosfotirosina de HER-3 realizado con anticuerpos anti-HER-3 de la invención. Los anticuerpos según la presente invención eran capaces de inhibir la activación de HER-3 mediada por β-HRG según se indica por un incremento en la fosforilación de tirosina del receptor. Por otra parte, la fig. 7b muestra resultados representativos de este experimento con anticuerpo valorado.

La Fig. 8 muestra el resultado de un ELISA de p42/p44 MAP-cinasa realizado con anticuerpos anti-HER-3 de la invención. Los anticuerpos según la presente invención eran capaces de reducir la activación de p42/p44 MAP-cinasa mediada por β-HRG según se indica por un incremento en la fosforilación de MAP-cinasa.

- 15 La Fig. 9 muestra el resultado de un ELISA de fosfo-AKT realizado con anticuerpos anti-HER-3 de la invención. Los anticuerpos según la presente invención eran capaces de reducir la activación de AKT mediada por β-HRG según se indica por la fosforilación de AKT.

- 20 La Fig. 10 muestra la inhibición de la proliferación de células MCF7 por anticuerpos anti-HER-3 humanos de la invención. Los anticuerpos según la presente invención inhiben el crecimiento celular inducido por HRG en células cancerosas humanas.

La Fig. 11 muestra la trans migración de células MCF7 inhibida por anticuerpos anti-HER-3 humanos de la invención.

Las Figs. 12a-i muestran la inhibición del crecimiento celular independiente del anclaje por anticuerpos para HER-3 humanos de la invención.

- 25 La Fig. 13 muestra la inhibición del crecimiento de xenoinjertos de células de cáncer de mama humano T47D por un anticuerpo anti-HER-3 humano de la invención.

La Fig. 14 muestra la reducción de células de cáncer de páncreas humano BxPC3 en ratones después de la administración de anticuerpos anti Her3 (U1-59 y U1-53) o anti EGFR (Erbixux).

La Fig. 15 muestra la reducción del crecimiento de xenoinjertos de células de cáncer de páncreas humano BxPC3 por un anticuerpo anti-HER-3 humano de la invención y en combinación con anticuerpos anti EGFR (Erbixux).

- 30 La Fig. 16 demuestra que los anticuerpos de la invención retrasan el crecimiento de células de melanoma humano (HT144) en ratones nu/nu.

La Fig. 17 muestra la reducción del crecimiento de xenoinjertos de células de carcinoma de colon humano HT-29 por anticuerpos para HER-3 humanos de la invención (U1-53, U1-59 y U1-7).

- 35 La Fig. 18 muestra la reducción del crecimiento de xenoinjertos de células de cáncer de pulmón humano Calu-3 por anticuerpos anti-HER-3 humanos de la invención (U1-59, U1-53 y U1-7).

La Fig. 19 muestra la reducción del crecimiento de xenoinjertos de células de cáncer de páncreas humano BxPC-3 por anticuerpos anti-HER-3 humanos de la invención (U1-7, U1-59 y U1-53).

La Fig. 20 demuestra que un anticuerpo de la invención (U1-59) provoca la supresión de HER-3 en xenoinjertos de cáncer de páncreas humano BxPC3.

40 **Sumario de la invención**

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado que se une a HER-3, que comprende una CDR1 de la cadena pesada representadas por GGSFSGYYWS, una CDR2 de la

cadena pesada representada por EINHSGSTNYNPSLKS y una CDR3 de la cadena pesada representada por DKWTWYFDL, y una CDR1 de la cadena ligera representada por RSSQSVLYSSSNRYLA, una CDR2 de la cadena ligera representada por WASTRES y una CDR3 de la cadena ligera representada por QQYYSTPRT.

5 En una realización de la presente invención, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID N°: 70 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO 72.

10 Según la presente invención, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado que es capaz de unirse a HER-3 interactúa con al menos un epítipo en la parte extracelular de HER-3. Los epítipos están situados preferiblemente en el dominio L1 (aa 19-184) que es el dominio aminoterminal, en el dominio S1 (aa 185-327) y S2 (aa 500-632) que son los dos dominios ricos en cisteína, o en el dominio L2 (328-499) que está flanqueado por los dos dominios ricos en cisteína. Los epítipos también pueden estar situados en combinaciones de dominios tales como, pero no limitadas a, un epítipo comprendido por partes de L1 y S1. Se prefiere más un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado que se una a una estructura tridimensional formada por los residuos de aminoácido 1-160, 161-358, 359-15 575, 1-358 y/o 359-604 de HER-3 maduro, particularmente de HER-3 humano maduro.

Preferiblemente, el anticuerpo anti-HER-3 es U1-59 (SEQ ID N°: 70/72) o un anticuerpo que tiene al menos una cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo.

20 Además, realizaciones adicionales de la presente invención proporcionan un anticuerpo o fragmento de anticuerpo acoplado a un grupo de etiquetaje o un grupo efector. Preferiblemente, tal anticuerpo o fragmento de anticuerpo es útil para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, particularmente enfermedades oncológicas tales como cáncer de mama, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de estómago, cáncer endometrial, cáncer de las glándulas salivares, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de 25 colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga urinaria, glioma, melanoma, cáncer de testículo, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de cabeza y cuello, u otros cánceres que expresan o sobreexpresan HER-3, y la formación de metástasis tumorales.

30 Otros aspectos de la presente invención se refieren a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, un vector que tiene una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, y una célula hospedadora, p. ej. una célula CHO, una célula de mieloma NS/0, transformada con tal molécula de ácido nucleico o vector.

35 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para producir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención al preparar dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo a partir de una célula hospedadora que secreta el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención se prepara a partir de una línea celular de hibridoma que secreta un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o una célula CHO u otro tipo de célula transformado con una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención.

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención al preparar dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo a partir de un tejido, producto o secreción de un animal, una planta o un hongo transgénico para una molécula de ácido nucleico o moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención. Preferiblemente, un anticuerpo o fragmento 45 de anticuerpo de la invención se prepara a partir del tejido, producto o secreción de un animal transgénico tal como una vaca, una oveja, un conejo, un pollo u otra especie de mamífero o ave, una planta transgénica tal como maíz, tabaco u otra planta, o un hongo transgénico tal como *Aspergillus*, *Pichia* u otra especie de hongo.

50 Otro aspecto de la presente invención trata de una composición farmacéutica que comprende como un agente activo al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención mezclado con portadores, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En otra realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica de la invención contiene adicionalmente al menos otro agente activo, p. ej. al menos un agente antineoplástico. Otro aspecto más de la presente invención trata del uso de al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, y opcionalmente al menos otro agente activo, p. ej. al menos un agente antineoplástico, 55 mezclados con portadores, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables para la preparación de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica es adecuada para diagnosticar, prevenir o tratar una enfermedad hiperproliferativa, particularmente una enfermedad oncológica tal como cáncer de mama, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de estómago, cáncer endometrial, cáncer de las glándulas salivares, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de 60 tiroides, cáncer de vejiga urinaria, glioma, melanoma u otros cánceres que expresan o sobreexpresan HER-3, y la formación de metástasis tumorales.

65 Por otra parte, la presente invención se refiere en un aspecto adicional al uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención en un método para diagnosticar enfermedades o afecciones asociadas con la expresión de HER-3, comprendiendo el método poner en contacto una muestra con al menos un anticuerpo o fragmento de

anticuerpo de la invención, bajo condiciones adecuadas para permitir la unión de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo a HER-3 e identificar la unión de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo a HER-3. Enfermedades o afecciones preferidas incluyen las enfermedades hiperproliferativas mencionadas anteriormente.

- 5 Otro aspecto más de la presente invención es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para el uso en un método para prevenir o tratar enfermedades o afecciones asociadas con la expresión de HER-3 en un paciente que lo necesite, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención y opcionalmente al menos otro agente activo, p. ej. al menos un agente neoplásico. Preferiblemente, el paciente es un paciente mamífero, más preferiblemente un paciente humano.
- 10 Enfermedades o afecciones asociadas con la expresión de HER-3 preferidas son las enfermedades hiperproliferativas mencionadas anteriormente.

15 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un estuche para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas con la expresión de HER-3, que comprende al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y/o molécula de ácido nucleico y/o vector de la invención. Opcionalmente, el estuche de la invención puede comprender además al menos otro agente activo, p. ej. al menos un agente antineoplásico. Preferiblemente, las enfermedades o afecciones asociadas con la expresión de HER-3 son las enfermedades hiperproliferativas mencionadas anteriormente.

## 20 Descripción detallada

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a HER-3.

- 25 En una realización de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NO 70 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO 72.

30 Según la presente invención, se ha de entender que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención no se limita a los veinte aminoácidos convencionales (Véase *Immunology - A Synthesis* (2ª Edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Por ejemplo, los aminoácidos pueden incluir estereoisómeros (p. ej. D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos  $\alpha$ , $\alpha$ -disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales. Ejemplos de aminoácidos no convencionales, que también pueden ser componentes adecuados para el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, incluyen: 4-hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato,  $\epsilon$ -N,N,N-trimetil-lisina,  $\epsilon$ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina,  $\sigma$ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares, p. ej. 4-hidroxiprolina.

40 Por otra parte, según la presente invención, se contempla que variaciones pequeñas en las secuencias de aminoácidos estén abarcadas por la presente invención, con la condición de que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, 90%, 95%, y lo más preferiblemente 99% de las secuencias mostradas en SEQ ID N°: 70 y 72. Las variaciones se pueden producir en las regiones de armazón (es decir fuera de las CDR), pero no dentro de las CDR. Las variaciones preferidas en las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID N°: 70 y 72, es decir supresiones, inserciones y/o sustituciones de al menos un aminoácido, se producen cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales se pueden identificar mediante comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o patentadas. Se pueden usar métodos de comparación informáticos para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación proteínicos predichos que se presentan en otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo de estructura y/o función conocida. Se conocen métodos para identificar secuencias proteínicas que se pliegan en una estructura tridimensional. Véanse, p. ej., Bowie y cols., *Science* 253, 164 (1991); *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton y cols., *Nature* 354, 105 (1991). Así, los expertos en la especialidad pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que se pueden usar para definir dominios estructurales y funcionales según la invención.

55 Variaciones especialmente preferidas en las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID N°: 70 y 72 son las que conducen a una reducción de la sensibilidad a la proteólisis o la oxidación, alteran los patrones de glicosilación o alteran las afinidades de unión o confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En particular, se contemplan sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones conservativas son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Familias de aminoácidos preferidas son las siguientes: familia ácida = aspartato, glutamato; familia básica = lisina, arginina, histidina; familia no polar = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y familia polar no cargada = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Familias más preferidas son: familia alifática-hidroxilada = serina y treonina; familia que contiene amida = asparagina y glutamina; familia alifática = alanina, valina, leucina e isoleucina; y familia aromática =

fenilalanina, triptófano y tirosina. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución similar de un aminoácido por un aminoácido relacionado estructuralmente, no tenga un efecto importante sobre la unión o las propiedades del anticuerpo o fragmento de anticuerpo resultante, especialmente si la sustitución no implica a un aminoácido dentro de un sitio de armazón. Sin embargo, todas las otras posibles sustituciones de aminoácidos también son abarcadas por la presente invención. Si un cambio de aminoácido da como resultado un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional, es decir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a HER-3 y reduce la transducción de señales de miembros de la familia de HER, se puede determinar fácilmente al ensayar la actividad específica del anticuerpo o fragmento de anticuerpo resultante en ELISA o FACS con respecto a la unión a HER-3 o un ensayo funcional in vitro o in vivo.

Según la presente invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención interactúa con al menos un epítipo en la parte extracelular de HER-3. Los epítopos están situados preferiblemente en el dominio L1 (aa 19-184), que es el dominio aminoterminal, en el dominio S1 (aa 185-327) y S2 (aa 500-632), que son los dos dominios ricos en cisteína, en el dominio L2 (328-499), que está flanqueado por los dos dominios ricos en cisteína, o en una combinación de dominios de HER-3. Los epítopos también pueden estar situados en combinaciones de dominios tales como, pero no limitados a, un epítipo comprendido por partes de L1 y S1. Por otra parte, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención se caracteriza además por que su unión a HER-3 reduce la transducción de señales mediada por HER-3. Según la presente invención, una reducción de la transducción de señales mediada por HER-3 puede estar provocada, p. ej., por una regulación a la baja de HER-3 que da como resultado la desaparición al menos parcial de moléculas de HER-3 de la superficie celular o por una estabilización de HER-3 sobre la superficie celular en una forma sustancialmente inactiva, es decir una forma que exhibe una transducción de señales menor en comparación con la forma no estabilizada. Alternativamente, una reducción de la transducción de señales mediada por HER-3 también se puede provocar al influir, p. ej. disminuir o inhibir, la unión de un ligando u otro miembro de la familia de HER a HER-3, de GRB2 a HER-2 o de GRB2 a SHC, al inhibir la fosforilación de tirosinas receptoras, la fosforilación de AKT, la fosforilación de la tirosina PYK2 o la fosforilación de ERK2, o al disminuir la invasividad tumoral. Alternativamente, una reducción de la transducción de señales mediada por HER-3 también se puede provocar al influir, p. ej., disminuir o inhibir, la formación de dímeros que contienen HER-3 con otros miembros de la familia de HER. Un ejemplo entre otros puede ser la disminución o la inhibición de la formación de complejos proteínicos de HER3-EGFR.

El término "anticuerpo" o "anticuerpo anti-HER-3", según se usa en la presente, significa un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humanizado (Jones y cols., *Nature* 321 (1986), 522-525; Riechmann y cols., *Nature* 332 (1988), 323-329; y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2 (1992), 593-596), un anticuerpo quimérico (Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 (1984), 6851-6855), un anticuerpo multispecifico (p. ej. un anticuerpo biespecifico) formado por al menos dos anticuerpos, o un fragmento de anticuerpo de los mismos. El término "fragmento de anticuerpo" comprende cualquier porción de los susodichos anticuerpos, preferiblemente sus regiones de unión a antígeno variables. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, diacuerpos (Hollinger y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993), 6444-6448), moléculas de anticuerpo monocatenarias (Plückthun en: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* 113, Rosenberg y Moore, EDS, Springer Verlag, N.Y. (1994), 269-315) y otros fragmentos con tal de que exhiban la capacidad deseada de unión a HER-3.

Además, el término "anticuerpo" o "anticuerpo anti-HER-3", según se usa en la presente, puede incluir moléculas similares a anticuerpo que contienen subdominios manipulados de anticuerpos o variantes de anticuerpos presentes en la naturaleza. Estas moléculas similares a anticuerpos pueden ser anticuerpos de un solo dominio tales como dominios solamente VH o solamente VL derivados bien de fuentes naturales tales como camélidos (Muyldermans y cols., *Reviews in Molecular Biotechnology* 74, 277-302) o a través de exposición in vitro de bibliotecas procedentes de seres humanos, camélidos u otras especies (Holt y cols., *Trends Biotechnol.*, 21, 484-90).

Según la presente invención, el "fragmento Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento de y unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera en asociación no covalente estrecha. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. Colectivamente, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque habitualmente con una afinidad inferior que el sitio de unión entero. El "fragmento Fab" también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. El "fragmento Fab" difiere del "fragmento Fab'" por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio de la cadena pesada CH1 incluyendo una o más cisteínas procedentes de la región bisagra del anticuerpo. El "fragmento F(ab')<sub>2</sub>" se produce originalmente como un par de "fragmentos Fab'" que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. Métodos para preparar tales fragmentos de anticuerpo, tales como digestión con papaína o pepsina, son conocidos por los expertos en la especialidad.

En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo anti-HER-3 de la invención es del tipo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, preferiblemente del tipo IgG o IBM, incluyendo, pero no limitados a, el tipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM1 e IgM2. En las realizaciones más preferidas, el anticuerpo es del tipo IgG1, IgG2 o IgG4.

- 5 En otra realización preferida de la presente invención, el anticuerpo anti-HER-3 de la invención es anti-HER-3 dirigido contra el dominio extracelular (ECD) de HER-3.

En ciertos aspectos, p. ej. en relación con la generación de anticuerpos como candidatos terapéuticos contra HER-3, puede ser deseable que el anticuerpo anti-HER-3 de la invención sea capaz de fijar el complemento y participar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Existe un número de isotipos de anticuerpos que son capaces de lo mismo, incluyendo, sin limitaciones, los siguientes: IBM murina, IgG2a murina, IgG2b murina, IgG3 murina, IBM humana, IgG1 humana, IgG3 humana e IgA humana. Se apreciará que los anticuerpos que se generan no necesitan poseer inicialmente tal isotipo sino que, en cambio, el anticuerpo según se genera puede poseer cualquier isotipo y el anticuerpo puede cambiar de isotipo al adjuntar los genes o ADNc de la región V molecularmente clonados a genes o ADNc de la región constante molecularmente clonados en vectores de expresión apropiados usando técnicas de biología molecular convencionales que son muy conocidas en la especialidad y a continuación expresar los anticuerpos en células hospedadoras usando técnicas conocidas en la especialidad. El anticuerpo con isotipo cambiando también puede poseer una región Fc que se ha manipulado molecularmente para poseer CDC superior sobre las variantes presentes en la naturaleza (Idusogie y cols., J Immunol., 166, 2571-2575) y se ha expresado recombinantemente en células hospedadoras usando técnicas conocidas en la especialidad. Tales técnicas incluyen el uso de técnicas recombinantes directas (véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N° 4.816.397), técnicas de fusión célula-célula (véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N° 5.916.771 y 6.207.418), entre otras. En la técnica de fusión célula-célula, se prepara una línea celular de mieloma u otra tal como CHO que posee una cadena pesada con cualquier isotipo deseado y se prepara otra línea celular de mieloma u otra tal como CHO que posee la cadena ligera. Posteriormente, tales células se pueden fusionar y se puede aislar un línea celular que expresa un anticuerpo intacto. A modo de ejemplo, un anticuerpo anti-IgG4 de HER-3 humano, que posee la unión deseada al antígeno HER-3, se podría cambiar fácilmente de isotipo para generar un isotipo de IgM humana, IgG1 humana o IgG3 humana, mientras que todavía poseería la misma región variable (que define la especificidad del anticuerpo y algo de su afinidad). Tal molécula podría ser capaz entonces de fijar el complemento y participar en la CDC.

Por otra parte, también puede ser deseable que el anticuerpo anti-HER-3 de la invención sea capaz de unirse a receptores Fc sobre células efectoras, tales como monocitos y células asesinas naturales (NK), y participe en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Existe un número de isotipos de anticuerpos que son capaces de lo mismo, incluyendo, sin limitación, los siguientes: IgG2a murina, IgG2b murina, IgG3 murina, IgG1 humana e IgG3 humana. Se apreciará que los anticuerpos que se generan no necesitan poseer inicialmente tal isotipo sino que, en cambio, el anticuerpo según se genera puede poseer cualquier isotipo y el anticuerpo puede cambiar de isotipo al adjuntar los genes o ADNc de la región V molecularmente clonados a genes o ADNc de la región constante molecularmente clonados en vectores de expresión apropiados usando técnicas de biología molecular convencionales que son muy conocidas en la especialidad y a continuación expresar los anticuerpos en células hospedadoras usando técnicas conocidas en la especialidad. El anticuerpo con isotipo cambiando también puede poseer una región Fc que se ha manipulado molecularmente para poseer ADCC superior sobre las variantes presentes en la naturaleza (Shields y cols. J Biol Chem., 276, 6591-6604) y se ha expresado recombinantemente en células hospedadoras usando técnicas conocidas en la especialidad. Tales técnicas incluyen el uso de técnicas recombinantes directas (véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N° 4.816.397), técnicas de fusión célula-célula (véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N° 5.916.771 y 6.207.418), entre otras. En la técnica de fusión célula-célula, se prepara una línea celular de mieloma u otra tal como CHO que posee una cadena pesada con cualquier isotipo deseado y se prepara otra línea celular de mieloma u otra tal como CHO que posee la cadena ligera. Posteriormente, tales células se pueden fusionar y se puede aislar un línea celular que expresa un anticuerpo intacto. A modo de ejemplo, un anticuerpo anti-IgG4 de HER-3 humano, que posee la unión deseada al antígeno HER-3, se podría cambiar fácilmente de isotipo para generar un isotipo IgG1 humana o IgG3 humana, mientras que todavía poseería la misma región variable (que define la especificidad del anticuerpo y algo de su afinidad). Tal molécula podría ser capaz entonces de unirse a FcγR sobre células efectoras y participar en la ADCC.

Por otra parte, según la presente invención, se aprecia que en anticuerpo anti-HER-3 de la invención es un anticuerpo completamente humano o humanizado. Los anticuerpos humanos evitan ciertos de los problemas asociados con anticuerpos xenogéneos, por ejemplo anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes de murino o rata. La presencia de proteínas derivadas xenogénicamente tales como proteínas de murino o rata puede conducir a la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo por un paciente, conduciendo posteriormente a la depuración rápida de los anticuerpos, pérdida de utilidad terapéutica a través de la neutralización del anticuerpo y/o reacciones alérgicas graves, incluso potencialmente letales.

Preferiblemente, el anticuerpo anti-HER-3 de la invención es el anticuerpo gU1-59.

En una realización preferida de la presente invención, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención se acopla a un grupo de etiquetaje. Tal anticuerpo o fragmento de anticuerpo es particularmente adecuado para aplicaciones de diagnóstico. Según se usa en la presente, el término "grupo de etiquetaje" se refiere a un marcador

detectable, p. ej. un aminoácido radioetiquetado o un resto biotinilado que se puede detectar mediante avidina marcada (p. ej. estreptavidina unida a un marcador fluorescente o una actividad enzimática que se puede detectar mediante métodos ópticos o colorimétricos). Diversos métodos para etiquetar polipéptidos y glicoproteínas, tales como anticuerpos, se conocen en la especialidad y se pueden usar al realizar la presente invención. Ejemplos de grupos de etiquetaje adecuados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p. ej.  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), grupos fluorescentes (p. ej. FITC, rodamina, fósforos lantánidos), grupos enzimáticos (p. ej. peroxidasa de rábano picante,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos biotinilados o epítomos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (p. ej. secuencias del par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcas epitópicas). En ciertos aspectos, puede ser deseable que los grupos de etiquetaje estén enlazados por ramas espaciadoras de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

Alternativamente, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención se puede acoplar a un grupo efector en otra realización preferida de la invención. Tal anticuerpo o fragmento de anticuerpo es especialmente adecuado para aplicaciones terapéuticas. Según se usa en la presente, el término "grupo efector" se refiere a un grupo citotóxico tal como un radioisótopo o radionúclido, una toxina, un grupo terapéutico u otro grupo efector conocido en la especialidad. Ejemplos de grupos efectores adecuados son radioisótopos o radionúclidos (p. ej.  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), caliqueamicina, análogos de dolastatina tales como auristatinas, y agentes quimioterapéuticos tales como derivados de geldanamicina y maitansina, incluyendo DM1. En ciertos aspectos, puede ser deseable que los grupos efectores estén enlazados por ramas espaciadoras de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado de la invención, que comprende la etapa de aislar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una célula hospedadora que secreta el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Células hospedadoras, que se pueden usar según la presente invención, son hibridomas; células eucarióticas tales como células de mamífero, p. ej. células de hámster, conejo, rata, cerdo, ratón u otro animal, células vegetales, células fúngicas, p. ej. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*; células procarióticas tales como *E. coli*; y otras células usadas en la especialidad para la producción de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo. Diversos métodos para preparar y aislar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de células hospedadoras se conocen en la especialidad y se pueden usar al realizar la presente invención. Por otra parte, métodos para preparar fragmentos de anticuerpo, tales como digestión con papaína o pepsina, técnicas de clonación modernas, técnicas para preparar moléculas de anticuerpo monocatenarias (Plückthun en: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* 113, Rosenberg y Moore, EDS, Springer Verlag, N.Y. (1994), 269-315) y diacuerpos (Hollinger y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993), 6444-6448), también son conocidos por los expertos en la especialidad y se pueden usar al realizar la presente invención.

En una realización preferida de la presente invención, se prepara un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención a partir de un hibridoma que secreta el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Véase, p. ej., Köhler y cols., *Nature* 256 (1975), 495.

En una realización preferida adicional de la presente invención, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención se prepara recombinantemente al optimizar y/o amplificar la expresión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en una célula hospedadora y aislar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de dicha célula hospedadora. A este fin, las células hospedadoras se transforman o transfectan con ADN que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o un vector que contiene ADN que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo y se cultivan bajo condiciones apropiadas para producir el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención. Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N° 4.816.567. Células hospedadoras preferidas pueden ser células CHO, células de mieloma NS/O, células 293 de riñón embrionario humano, *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Los anticuerpos se pueden preparar a partir de animales genéticamente manipulados para elaborar anticuerpos completamente humanos o a partir de una biblioteca de exposición de anticuerpos elaborada en un bacteriófago, una levadura, un ribosoma o *E. coli*. Véanse, p. ej., Clackson y cols., *Nature* 352 (1991), 624-628, Marks y cols., *J. Mol. Biol.* 222 (1991), 581-597, Feldhaus y Siegel *J Immunol Methods.* 290, 69-80, Groves y Osbourn, *Expert Opin Biol Ther.*, 5, 125-135 y Jostock y Dubel, *Comb Chem High Throughput Screen.* 8, 127-133.

Los anticuerpos humanos evitan algunos de los problemas asociados con anticuerpos que poseen regiones variables y/ constantes de múrido o rata. La presencia de tales proteína derivadas de múrido o rata puede conducir a la depuración rápida de los anticuerpos o puede conducir a la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo por un paciente. A fin de evitar la utilización de anticuerpos derivados de múrido o rata, se pueden generar anticuerpos completamente humanos a través de la introducción de loci de anticuerpos humanos funcionales en un roedor, otro mamífero o animal, de modo que el roedor, otro mamífero o animal produzca anticuerpos completamente humanos.

Un método para generar anticuerpos completamente humanos es a través de uso de cepas XENOMOUSE® de ratones que se han manipulado para contener fragmentos de configuración de línea germinal de 245 kb y 190 kb de

tamaño del locus de la cadena pesada humana y el locus de la cadena ligera kappa. Otras cepas Xenomouse de ratones contienen fragmentos de configuración de línea germinal de 980 kb y 800 kb de tamaño del locus de la cadena pesada humana y el locus de la cadena ligera kappa. Otras cepas Xenomouse de ratones adicionales contienen fragmentos de configuración de línea germinal de 980 kb y 800 kb de tamaño del locus de la cadena pesada humana y el locus de la cadena ligera kappa más un locus de la cadena ligera lambda humana completo configurado con línea germinal de 740 kb de tamaño. Véanse Mendez y cols. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) y Green y Jakobovits J. *Exp. Med.* 188:483-495 (1998). Las cepas XENOMOUSE<sup>®</sup> están disponibles de Abgenix, Inc. (Fremont, CA).

La producción de los ratones XENOMOUSE<sup>®</sup> se analiza y esboza adicionalmente en las Solicitudes de Patente de EE. UU. N° de Serie 07/466.008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/610.515, presentada el 8 de noviembre de 1990, 07/919.297, presentada el 24 de julio de 1992, 07/922.649, presentada el 30 de julio de 1992, 08/031.801, presentada el 15 de marzo de 1993, 08/112.848, presentada el 27 de agosto de 1993, 08/234.145, presentada el 28 de abril de 1994, 08/376.279, presentada el 20 de enero de 1995, 08/430.938, 27 de abril de 1995, 08/464.584, presentada el 5 de junio de 1995, 08/464.582, presentada el 5 de junio de 1995, 08/463.191, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.837, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.853, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.857, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.859, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.513, presentada el 5 de junio de 1995, 08/724.752, presentada el 2 de octubre de 1996, y 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996, la Publicación de Patente de EE. UU. 2003/0217373, presentada el 20 de noviembre de 2002, y las Patentes de EE. UU. N° 6.833.268, 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181 y 5.939.598 y las Patentes Japonesas N° 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2. Véanse además la Patente Europea N° EP 0 463 151 B1, concesión publicada el 12 de junio de 1996, la Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, la Solicitud de Patente Internacional N° WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996, WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998, WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000.

En un enfoque alternativo, otros, incluyendo GenPharm International, Inc., han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, se imita un locus Ig exógeno a través de la inclusión de trozos (genes individuales) procedentes del locus Ig. Así, uno o más genes de V<sub>H</sub>, uno o más genes de D<sub>H</sub>, uno o más genes de J<sub>H</sub>, una región constante mu y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) se forman en una construcción para la inserción en un animal. Este enfoque se describe en la Patente de EE. UU. N° 5,545.807 de Surani y cols. y las Patentes de EE. UU. N° 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.877.397, 5.874.299 y 6.255.458, cada una de Lonberg y Kay, las Patentes de EE. UU. N° 5.591.669 y 6.023.010 de Krimpenfort y Berns, las Patentes de EE. UU. N° 5.612.205, 5.721.367 y 5.789.215 de Berns y cols., y la Patente de EE. UU. N° 5.643.763 de Choi y Dunn, y las Solicitudes de Patente Internacional de GenPharm N° de Serie 07/574.748, presentada el 29 de agosto de 1990, 07/575.962, presentada el 31 de agosto de 1990, 07/810.279, presentada el 17 de diciembre de 1991, 07/853.408, presentada el 18 de marzo de 1992, 07/904.068, presentada el 23 de junio de 1992, 07/990.860, presentada el 16 de diciembre de 1992, 08/053.131, presentada el 26 de abril de 1993, 08/096.762, presentada el 22 de julio de 1993, 08/155.301, presentada el 18 de noviembre de 1993, 08/161.739, presentada el 3 de diciembre de 1993, 08/165.699, presentada el 10 de diciembre de 1993, 08/209.741, presentada el 9 de marzo de 1994. Véanse además la Patente Europea N° 0 546 073 B1, las Solicitudes de Patente Internacional N° WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 y WO 98/24884 y la Patente de EE. UU. N° 5.981.175. Véanse además Taylor y cols., 1992, Chen y cols., 1993, Tuailon y cols., 1993, Choi y cols., 1993, Lonberg y cols., (1994), Taylor y cols., (1994), and Tuailon y cols., (1995), Fishwild y cols., (1996).

Kirin también ha demostrado la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los que, a través de fusión microcelular, se han introducido grandes trozos de cromosomas, o cromosomas enteros. Véanse las Solicitudes de Patente Europea N° 773 288 y 843 961. Adicionalmente, se han generado ratones KM<sup>TM</sup>-, que son el resultado del cruce de ratones Tc de Kirin con ratones con minilocus de Medarex (Humab). Estos ratones poseen el transcromosoma HC de los ratones de Kirin y el transgén de la cadena kappa de los ratones Medarex (Ishida y cols., *Cloning Stem Cells*, (2002) 4:91-102).

Los anticuerpos humanos también se pueden derivar mediante métodos *in vitro*. Ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, exposición de fagos (como la comercializada por Cambridge Antibody Technology, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (anteriormente Proliferon), Affimed), exposición de ribosomas (como la comercializada por Cambridge Antibody Technology), exposición de levaduras, y similares.

Los anticuerpos, que se describen en la presente, se prepararon a través de la utilización de la tecnología XENOMOUSE<sup>®</sup>, según se describe posteriormente. A continuación, tales ratones son capaces de producir moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos humanos y son deficientes en la producción de moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos murinos. Tecnologías utilizadas para conseguir lo mismo se divulgan en las patentes, solicitudes y referencias divulgadas en la sección de antecedentes de la presente. En particular, sin embargo, una realización preferida de producción transgénica de ratones y anticuerpos procedentes de los mismos se divulga en la Solicitud de Patente de EE. UU. N° de Serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996, y las Solicitudes de Patente Internacional N° WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998, y WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000. Véase además Mendez y cols. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997).

A través del uso de tal tecnología, se han producido anticuerpos monoclonales completamente humanos. Esencialmente, las líneas de ratones XENOMOUSE<sup>®</sup> se inmunizan con un antígeno de interés (p. ej. HER-3), se recuperan células linfáticas (tales como células B) de los ratones que expresan anticuerpos, y las líneas celulares recuperadas se fusionan con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales. Estas líneas celulares de hibridoma se criban y se seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que produjeran anticuerpos específicos para el antígeno de interés. Se proporcionan en la presente métodos para la producción de múltiples líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para HER-3. Además, se proporciona en la presente la caracterización de los anticuerpos producidos por tales líneas celulares, incluyendo análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de tales anticuerpos.

En general, los anticuerpos producidos por los hibridomas fusionados eran cadenas pesadas de IgG1 humana con cadenas ligeras kappa completamente humanas. Los anticuerpos descritos en la presente poseen cadenas pesadas de IgG4 humana así como cadenas pesadas de IgG1. Los anticuerpos también pueden ser de otros isotipos humanos, incluyendo IgG2 o IgG3. Los anticuerpos poseían altas afinidades, poseyendo típicamente una  $K_D$  de aproximadamente  $10^{-6}$  a aproximadamente  $10^{-13}$  M o menos, cuando se mide mediante técnicas en fase sólida y basadas en células.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención. Dentro del contexto de la presente invención, el término "molécula de ácido nucleico aislada", según se usa en la presente, significa un polinucleótido de ADNc genómico, o un origen sintético o alguna combinación del mismo, que, en virtud de su origen, la "molécula de ácido nucleico aislada" (1) no está asociada con la totalidad o una porción de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está conectada operativamente a un polinucleótido al que no está conectado en la naturaleza, o (3) no está presente en la naturaleza como parte de una secuencia mayor. Además, el término "molécula de ácido nucleico", según se menciona en la presente, significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, bien ribonucleótidos o bien desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido, tales como nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituido y similares. El término también incluye formas de ADN de una sola hebra y doble hebra.

En una realización de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la invención está conectada operativamente a una secuencia de control. El término "secuencia de control", según se usa en la presente, se refiere a secuencias polinucleotídicas que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador. En los procariontes, tales secuencias de control incluyen generalmente promotores, sitios de unión ribosómica y secuencias de terminación de la transcripción. En los eucariotes, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. Según la presente invención, el término "secuencia de control" está destinado a incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de socios de fusión. Por otra parte, el término "conectado operativamente", según se usa en la presente, se refiere a posiciones de componentes así descritos que están en una relación que los permite funcionar en su modo pretendido. Además, según la presente invención, una secuencia de control de la expresión conectada operativamente a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consiga bajo condiciones compatibles con la secuencia de control de la expresión.

Un aspecto adicional de la presente invención es un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención. La molécula de ácido nucleico puede estar conectada operativamente a una secuencia de control. Por otra parte, el vector puede contener adicionalmente un origen de replicación o un gen marcador de selección. Ejemplos de vectores que se pueden usar según la presente invención son, p. ej., plásmidos, cósmidos, fagos, virus, etc.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula hospedadora transformada con una molécula de ácido nucleico o un vector de la invención. La transformación se podría realizar mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora, incluyendo, por ejemplo, empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula hospedadora con el virus (o el vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la especialidad, como los ejemplificados por las Patentes de EE. UU. N° 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. Particularmente, los métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son muy conocidos en la especialidad e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada con polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido o los polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos. Ejemplos de células hospedadoras que se pueden usar según la presente invención son células eucarióticas de hibridoma tales como células de mamífero, p. ej. células de hámster, conejo, rata, cerdo, ratón u otras células animales; células vegetales y células fúngicas, p. ej. maíz, tabaco, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*; células procarióticas tales como *E. coli*; y otras células de la especialidad para la producción de

anticuerpos. Especialmente, las líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadores para la expresión son muy conocidas en la especialidad e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de the American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo pero no limitadas a células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej. Hep G2) y un número de otras líneas celulares.

Otro aspecto más de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende como un agente activo al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención y portadores, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. El término "composición farmacéutica", según se usa en la presente, se refiere a un compuesto químico o una composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente (The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms, Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)). Según la presente invención, la potencia de la composición farmacéutica de la invención se basa en la unión del al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo a HER-3. Preferiblemente, esta unión conduce a un reducción de la transducción de señales mediada por HER-3.

Por otra parte, el término "portadores", cuando se usa en la presente, incluye portadores, excipientes o estabilizantes que son atóxicos para la célula o el mamífero que se expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado o un liposoma (una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para el aporte de un fármaco a un mamífero). Ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes sacáricos tales como manitol o sorbitol; iones conjugados formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

En una realización de la presente invención, el al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención contenido en la composición farmacéutica está acoplado a un efector, tal como caliqueamicina, auristatina-PE, un radioisótopo o un agente quimioterapéutico tóxico tal como geldanamicina y maitansina. En particular, estos conjugados de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo son útiles para elegir como diana células, p. ej. células cancerosas, que expresan HER-3 para la eliminación.

Por otra parte, conectar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención a radioisótopos, p. ej., proporciona ventajas a los tratamientos de tumores. A diferencia de la quimioterapia y otras formas de tratamiento del cáncer, la radioinmunoterapia o la administración de una combinación de radioisótopo-anticuerpo o fragmento de anticuerpo directamente elige como diana las células cancerosas con daño mínimo al tejido sano normal circundante. Con esta "bala mágica", el paciente puede ser tratado con cantidades mucho menores de radioisótopos que otras formas de tratamiento disponibles actualmente. Radioisótopos preferidos incluyen itrio ( $^{90}\text{Y}$ ), indio $^{111}$  ( $^{111}\text{In}$ ),  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ , radioplatina-111, radioplatina-199 y bismuto $^{213}$ . La conexión de radioisótopos a anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención se puede realizar, p. ej., con quelatos bifuncionales convencionales. Puesto que la plata es monovalente, para la conexión de radioplatina-111 y radioplatina-199, se pueden utilizar conectores basados en azufre (Hazra y cols., Cell Biophys. 24-25, 1-7 (1994)). La conexión de radioisótopos de plata puede implicar reducir la inmunoglobulina con ácido ascórbico. Por otra parte, el tiuxetano es un quelador conector de MX-DTPA enlazado a ibritumomab para formar ibritumomab-tiuxetano (Zevalin) (Witzig, T.E, Cancer Chemother. Pharmacol. 48 Supl 1, 91-5 (2001)). El ibritumomab-tiuxetano puede reaccionar con radioisótopos tales como indio $^{111}$  ( $^{111}\text{In}$ ) o  $^{90}\text{Y}$  para formar  $^{111}\text{In}$ -ibritumomab-tiuxetano y  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab-tiuxetano, respectivamente.

Por otra parte, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, particularmente cuando se usa para tratar el cáncer, se puede conjugar con fármacos quimioterapéuticos tóxicos tales como caliqueamicina (Hamann y cols., Bioconjug. Chem. 13(1), 40-6 (2002)), geldanamicina (Mandler y cols., J. Natl. Cancer Inst., 92(19), 1549-51 (2000)) y maitansina, por ejemplo, el fármaco maitansinoide DM1 (Liu y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:8618-8623 (1996)). Se pueden emplear con esta tecnología diferentes conectores que liberan los fármacos bajo condiciones ácidas o reductoras o durante la exposición a proteasas específicas. Según la presente invención, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención se puede conjugar como se describe en la especialidad.

La auristatina-PE, p. ej., es un agente antimicrotubular que es una modificación estructural del constituyente peptídico de moluscos marinos sin concha dolastatina 10. La auristatina-PE tiene tanto actividad antitumoral como actividad vascular antitumoral (Otani y cols., Jpn. J. Cancer Res. 91(8), 837-44 (2000)). Por ejemplo, la auristatina-PE inhibe el crecimiento celular e induce la detención del ciclo celular y la apoptosis en líneas celulares de cáncer pancreático (Li y cols., Int. J. Mol. Med. 3(6), 647-53 (1999)). Según esto, para dirigir específicamente la actividad antitumoral y las actividades vasculares antitumorales de la auristatina-PE a tumores particulares, la auristatina-PE se puede conjugar al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención.

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica comprende al menos un agente activo adicional. Ejemplos para agentes activos adicionales, que se pueden usar según la presente invención, son anticuerpos o inhibidores de bajo peso molecular de otras proteína cinasas receptoras, tales como EGFR, HER-2, HER-4, IGFR-1 o c-met, ligandos receptores tales como factor endotelial vascular (VEGF), agentes citotóxicos, tales como doxorrubicina, cisplatino o carboplatino, citocinas o agentes antineoplásticos. Muchos agentes antineoplásticos se conocen actualmente en la especialidad. En una realización, el agente antineoplástico se selecciona del grupo de proteínas terapéuticas incluyendo, pero no limitadas a, anticuerpos o proteínas inmunomoduladoras. En otra realización, el agente antineoplástico se selecciona del grupo de inhibidores de molécula pequeña o agentes quimioterapéuticos que consisten en inhibidores mitóticos, inhibidores de cinasa, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos intercaladores, inhibidores de factores de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de histona desacetilasa, agentes contra la supervivencia, modificadores de respuestas biológicas, antihormonas, p. ej. antiandrógenos y agentes antiangiogénicos. Cuando el agente antineoplástico es radiación, el tratamiento se puede conseguir con un fuente interna (braquiterapia BT) o externa (terapia de radicación con haces externos: EBRT).

La composición farmacéutica de la presente invención es especialmente adecuada para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa. La enfermedad hiperproliferativa puede estar, p. ej., asociada con un incremento de la transducción de señales de la familia HER. Particularmente, la enfermedad puede estar asociada con un incremento de la fosforilación de HER-3 y/o un incremento en la formación de complejos entre HER-3 y otros miembros de la familia HER y/o un incremento en la actividad de cinasa PI<sub>3</sub> y/o un incremento en la actividad de cinasa terminal c-jun y/o la actividad de AKT y/o un incremento en la actividad de ERK2 y/o la actividad de PYK2. Preferiblemente, la enfermedad hiperproliferativa se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de estómago, cáncer endometrial, cáncer de las glándulas salivares, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga urinaria, glioma, melanoma u otros cánceres que expresan o sobreexpresan HER-3, y la formación de metástasis tumorales.

Según la presente invención, el término "prevención o tratamiento", cuando se usa en la presente, se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el paciente necesita prevenir o frenar (reducir) la afección o trastorno patológico elegido. Los que necesitan prevención o tratamiento incluyen lo que ya tienen el trastorno así como los tendientes a tener el trastorno o aquellos en los que se ha de prevenir el trastorno. El paciente que necesita la prevención o el tratamiento es un paciente mamífero, es decir cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o de compañía, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el paciente que necesita tratamiento es un paciente humano.

Según la presente invención, la composición farmacéutica de la invención se puede formular al mezclar el agente o los agentes activos con portadores, diluyentes y/o adyuvantes fisiológicamente aceptables, y opcionalmente otros agentes que se incorporan habitualmente en formulaciones para proporcionar una mejora de la transferencia, el aporte, la tolerancia y similares. La composición farmacéutica de la invención se puede formular, p. ej., en la forma de formulaciones liofilizadas, soluciones acuosas, dispersiones o preparaciones sólidas, tales como comprimidos, grageas o cápsulas. Una multitud de formulaciones apropiadas se puede encontrar en el listado conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences (18<sup>a</sup> ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1990)), particularmente el Capítulo 87 de Block, Lawrence del mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de carbocera (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbocera. Cualquiera de las mezclas precedentes puede ser apropiada en tratamientos y terapias según la presente invención, con la condición de que el agente activo en la formulación no sea inactivado por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véanse además Baldrick P., "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance.", Regul. Toxicol. Pharmacol. 32(2), 210-218 (2000); Wang W., "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals.", Int. J. Pharm. 203(1-2), 1-60 (2000); Charman W.N., "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts.", J. Pharm. Sci. 89(8), 967-978 (2000); Powell y cols., "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA J. Pharm. Sci. Technol. 52, 238-311 (1998); y las citas de las mismas, para una información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y portadores bien conocidos en la química farmacéutica.

Otro aspecto de la presente invención trata del uso de al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado de la invención y opcionalmente al menos otro agente activo, p. ej. al menos un agente antineoplástico según se describe anteriormente, mezclados con portadores, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, para la fabricación de una composición farmacéutica para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa. Preferiblemente, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica como la descrita anteriormente y la enfermedad hiperproliferativa es una enfermedad hiperproliferativa como la mencionada anteriormente.

- Otro aspecto más de la presente invención está relacionado con el uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado en un método para diagnosticar enfermedades o afecciones asociadas con la expresión de HER-3, que comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención bajo condiciones adecuadas para permitir la unión de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo a HER-3, y detectar la presencia de HER-3 en la muestra. La muestra puede ser una célula que muestra expresión de HER-3, tal como una célula tumoral, una muestra de sangre u otra muestra adecuada. En una realización preferida de la presente invención, las enfermedades o afecciones asociadas con la expresión de HER-3 son las enfermedades hiperproliferativas definidas anteriormente.
- Según la presente invención, el método se puede usar, p. ej., para la detección de antígeno para HER-3 en una célula, para la determinación de la concentración de antígeno para HER-3 en pacientes que sufren una enfermedad hiperproliferativa como la mencionada anteriormente o para la estadificación de dicha enfermedad hiperproliferativa en un paciente. A fin de estadificar el avance de una enfermedad hiperproliferativa en un sujeto bajo estudio, o caracterizar la respuesta del sujeto a un ciclo de terapia, una muestra de sangre, p. ej., se puede tomar del sujeto y se determina la concentración del antígeno para HER-3 presente en la muestra. La concentración así obtenida se usa para identificar en qué intervalo de concentraciones cae el valor. El intervalo así identificado se correlaciona con un estadio de avance o un estadio de terapia identificado en las diversas poblaciones de sujetos diagnosticados, proporcionado de ese modo un estadio en el sujeto bajo estudio. Una biopsia del tejido enfermo, p. ej. con cáncer, obtenido del paciente también se puede usar para determinar la cantidad de antígeno para HER-3 presente. La cantidad de antígeno para HER-3 presente en el tejido enfermo se puede determinar mediante inmunohistoquímica, ELISA o matrices de anticuerpos usando los anticuerpos para HER3 de la invención. Otros parámetros de diagnóstico de interés son el estado de dimerización así como los socios de dimerización de la proteína de HER3 y el estado de activación de ella y sus socios. Métodos analíticos de proteínas para determinar esos parámetros son muy conocidos en la especialidad y son entre otros técnicas de transferencia Western e inmunoprecipitación, análisis por FACS, reticulación química, transferencia de energía con resonancia de bioluminiscencia (BRET), transferencia de energía con resonancia de fluorescencia (FRET) y similares (p. ej. Price y cols, *Methods in Molecular Biology*, 218: 255-268 (2002) o la tecnología eTag (documentos WO0503707, WO04091384, WO04011900).
- Por otra parte, la presente invención se refiere en otro aspecto a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado para el uso en un método para prevenir o tratar enfermedades o afecciones asociadas con la expresión de HER-3 en un paciente, comprendiendo el método administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención. Preferiblemente, las enfermedades o afecciones asociadas con la expresión de HER-3 son las enfermedades hiperproliferativas definidas anteriormente. El paciente que necesita prevención o tratamiento es un paciente mamífero, es decir cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja. y animales de zoológico, deportivos o de compañía, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el paciente que los necesita es un paciente humano.
- En una realización preferida de la presente invención, el métodos para prevenir o tratar una enfermedad hiperproliferativa en un paciente que lo necesite comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención y adicionalmente al menos otro agente activo, p. ej., al menos un agente antineoplástico como el mencionado anteriormente. Preferiblemente, el método es para inhibir el crecimiento, la migración o la invasión celular anormal.
- Además de los modos clásicos de administración de agentes terapéuticos de anticuerpo o fragmento de anticuerpo potenciales, p. ej. a través de las susodichas formulaciones, también se pueden usar según la invención modalidades de administración recientemente desarrolladas. Por ejemplo, se ha presentado la administración local de anticuerpo monoclonal etiquetado con <sup>131</sup>I para el tratamiento de tumores cerebrales primarios después de la extirpación quirúrgica. Adicionalmente, también se está estudiando clínicamente y preclínicamente la inyección intracerebral estereotáctica directa de anticuerpos monoclonales y sus fragmentos. La perfusión hiperosmolar intracarotídea es una estrategia experimental para dirigirse a una enfermedad maligna cerebral primaria con anticuerpos monoclonales humanos conjugados a fármacos.
- Dependiendo del tipo y la gravedad de la afección que se va a tratar, se pueden administrar de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg del al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención a un paciente que lo necesite, p. ej. mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección que se va a tratar, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad.
- La dosis del al menos un agente antineoplástico administrado depende de una variedad de factores. Estos son, por ejemplo, la naturaleza del agente, el tipo de tumor y la vía de administración. Se debe enfatizar que la presente no se limita a ninguna dosis.

Finalmente, la presente invención se refiere en un aspecto más a un estuche para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas asociadas con la transducción de señales mediada por HER-3, que comprende el al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y/o la molécula de ácido nucleico y/o el vector de la invención. Además, el estuche de la invención puede comprender además al menos otro agente activo, p. ej. al menos un agente antineoplástico como el mencionado anteriormente.

Además, la presente invención se explicará mediante los siguientes Ejemplos y las figuras con dibujos adjuntas.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos efectuados y los resultados alcanzados, se proporcionan solamente con propósitos ilustrativos y no se deben considerar limitativos de la presente invención.

#### Ejemplo 1: antígeno para HER-3 y preparación de líneas celulares

En el presente estudio, se prepararon proteínas de HER-3 recombinantes. El dominio extracelular de ADNc de HER-3 (ECD) se clonó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de pcDNA3-HER-3 (vector de expresión con HER-3 humano de longitud completa, C.Wallasch y cols., EMBO J. 14, 4267-4275) con cebadores basados en la secuencia de HER-3 (Genebank N° Reg. NM\_001982).

Los cebadores usados para la amplificación de HER-3 eran como sigue:

Cebador directo: 5'-CGGGATCCATGTCCTAGCCTAGGGGC-3' (SEQ ID N°: 233)

Cebador inverso: 5'-GCTCTAGATTAATGATGATGATGATGATGTTGTCCTAAA CAGTCTTG-3' (SEQ ID N°: 234)

El producto de PCR se digirió con BamH1 y XbaI y se ligó a pcDNA3 (Invitrogen) digerido con BamH1 y XbaI. Los plásmidos se transfectaron en células HEK293 usando un método de CaPO<sub>4</sub>. La proteína de fusión HER-3-HIS se purificó de medio acondicionado recogido a través de cromatografía de afinidad de Ni-NTA.

Se generaron células Rat1 HER-3 mediante transferencia génica retroviral. Brevemente, se sembraron células GP+E 86 ( $3 \times 10^5$ ) en un disco de cultivo de 60 mm y se transfectaron con 2 µg/ml de vector pIXSN o ADNc de pIXSN-HER-3 (C. Wallasch, PhD Thesis, Max-Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Alemania) usando el método del fosfato cálcico. Después de 24 h, el medio se reemplazó por medio reciente y las células GP+E 86 se incubaron durante 4-8 h. A continuación, las células Rat1 subconfluentes ( $2 \times 10^5$  células por placa de 6 cm) se incubaron con sobrenadantes de células GP+E 86 que liberaban pLXSN o pLXSN-HER-3 con alta concentración, virus p (>1 X 10<sup>6</sup> G418 c.f.u./ml; m.o.i. de 10) durante 4-12 h en presencia de Polybrene (4 mg/ml; Aldrich). Después de cambiar el medio se inició la selección de células Rat1 con G418. Habitualmente, se recogían clones estables después de la selección durante 21 días.

#### Ejemplo 2: expresión de HER-3 en líneas celulares cancerosas humanas

La tirosina cinasas receptoras, como por ejemplo HER-3, representan un papel crucial en la iniciación y el avance de enfermedades hiperproliferativas tales como la transición del crecimiento celular hiperplástico benigno hasta un carcinoma maligno. Puesto que la expresión de HER-3 varía entre células tumorales y tejido normal, un análisis de la expresión de HER-3 es un factor crítico para la identificación de subgrupos de pacientes que se beneficiarían del tratamiento con anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. Así, la expresión de HER-3 se cuantificó en un grupo de líneas celulares cancerosas humanas para elucidar el papel de HER-3 en la formación de cáncer humano. Se desarrollaron líneas celulares cancerosas según se recomienda por la ATCC. Con detalle, se recogieron  $10^5$  células con EDTA 10 mM en PBS, se lavaron una vez con tampón de FACS (PBS, FCS al 3%, azida al 0,4%) y se sembraron en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Las células se centrifugaron durante 3 min a 1000 rpm para retirar el sobrenadante y a continuación se resuspendieron con anticuerpo para α-HER-3 2D1D12 (documento WO03013602) (3 µg/ml). Las suspensiones celulares se incubaron sobre hielo durante 1 h, se lavaron dos veces con tampón de FACS y se resuspendieron con anticuerpo secundario (100 µl/pocillos) anti-PE humana de burro (Jackson) diluido 1:50 en tampón de FACS. Las suspensiones celulares se incubaron sobre hielo y en la oscuridad durante 30 min, se lavaron dos veces con tampón de FACS y se analizaron (FACS, Beckman Coulter). La Fig. 1 muestra resultados representativos del análisis y demuestra que HER-3 se expresa en una variedad de cánceres humanos.

Ejemplo 3: Inmunización y valoración

5 La proteína de ECD de HER-3, que se preparaba como se describe en el Ejemplo 1, y células C32 (melanoma humano; ATCC N° CRL-1585) se usaron como un antígeno. Se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra HER-3 al inmunizar secuencialmente ratones Xenomouse® (cepas Xenomouse®: XMG1 y XMG4, Abgenix, Inc. Fremont, CA). Los animales Xenomouse® se inmunizaron a través de la vía de la almohadilla para todas las inyecciones. El volumen total de cada inyección era 50 µl por ratón, 25 µl por almohadilla.

10 Para la Serie N° 1 (10 ratones XMG1), la inmunización inicial era con 10 µg de proteína de ECD de HER-3 mezclada 1:1 (v/v) con TITERMAX GOLD® (Sigma, Oakville, ON) por ratón. Las cinco inyecciones de recuerdo posteriores se realizaron con 10 µg de proteína de ECD de HER-3 mezclada 1:1 (v/v) con 100 µg de gel de alumbre (Sigma, Oakville, ON) en D-PBS libre de pirógenos. La sexta inyección de recuerdo consistía en 10 µg de proteína de ECD de HER-3 mezclada 1:1 (v/v) con TITERMAX GOLD®. La séptima inyección consistía en 10 µg de proteína de ECD de HER-3 mezclada 1:1 v/v con 100 µg de gel de alumbre. Una inyección de recuerdo final se realizó con 10 µg de proteína de ECD de HER-3 en DPBS libre de pirógenos, sin adyuvante. Los ratones Xenomouse® se inmunizaron los días 0, 4, 7, 11, 15, 20, 24 y 29 para este protocolo y las fusiones se realizaron el día 33. Los dos sangrados se realizaron a través del procedimiento de sangrado retroorbital el día 13 después de la cuarta inyección de recuerdo, el día 19 después de la sexta inyección de recuerdo. No había serie n° 2.

20 Para la Serie n° 3 (10 ratones XMG1) y la Serie n° 4 (10 ratones XMG4), la primera inyección era con  $10^7$  células C32 en PBS de Dulbecco (DPBS) libre de pirógenos mezclada 1:1 (v/v) con TITERMAX GOLD® por ratón. Las cuatro inyecciones de recuerdo siguientes eran con  $10^7$  células C32 en DPBS libre de pirógenos, mezclada con 25 µg de Adju-Phos y 10 µg de CpG por ratón. La sexta inyección de recuerdo era con  $10^7$  células C32 en DPBS libre de pirógenos, mezcladas 1:1 (v/v) con TITERMAX GOLD® por ratón. La séptima, octava y novena inyecciones de recuerdo eran con  $10^7$  células C32 en DPBS libre de pirógenos, mezclada con 25 µg de Adju-Phos y 10 µg CpG por ratón. De la décima a la decimocuarta inyecciones de recuerdo eran 5 µg de proteína de ECD de HER-3 en DPBS libre de pirógenos, mezclada con 25 µg de Adju-Phos y 10 µg de CpG por ratón. Una inyección de recuerdo final consistía en 5 µg de proteína de ECD de HER-3 en DPBS libre de pirógenos, sin adyuvante. Tanto en la Serie n° 3 como en la n° 4, los ratones Xenomouse® se inmunizaron los días 0, 3, 7, 11, 14, 17, 21, 24, 28, 33, 35, 38, 42 y 45 para este protocolo y las fusiones se realizaron el día 49. Los tres sangrados se realizaron a través del procedimiento de sangrado retroorbital en día 12 después de la cuarta inyección de recuerdo, el día 19 después de la sexta inyección de recuerdo y el día 40 después de la duodécima inyección de recuerdo.

#### Selección de animales para la recogida mediante valoración

35 Para la Serie n° 1, los títulos de anticuerpo anti-HER-3 en el suero de ratones Xenomouse® inmunizados se determinaron mediante ELISA frente a proteína de ECD de HER-3. El título específico de cada animal Xenomouse® se determinó a partir de la densidad óptica a 650 nm y se muestra en la Tabla 1 posteriormente. El valor del título es la recíproca de la dilución mayor de suero con una lectura de OD dos veces la del fondo. Por lo tanto, cuanto mayor sea el número, mayor será la respuesta inmunitaria humoral a ECD de HER-3.

TABLA 1

Serie N° 1, XGM1		
ID Ratón	Después de 4 iny.	Después de 6 iny.
P3421	8.000	11.000
P3422	850	2.600
P3423	2.700	5.200
P3424	3.200	9.100
P3425	5.400	2.500
P3426	700	1.500
P3427	5.800	7.000
P3428	3.900	4.300
P3429	2.200	2.500
P34210	600	850
NC	250	175
PC	377.000	311.000
NC	mAb IL-8, D39.2.1	
PC	xHER-3-2D1D12	

- 5 Para la serie N° 3 y N° 4, los títulos de anticuerpo anti-HER-3 en el suero de ratones Xenomouse® inmunizados se determinaron mediante FACS usando células Rat1/HER-3 (línea celular positiva a antígeno) y células Rat1/pLSXN (línea celular negativa a antígeno). Los datos se presentan como la intensidad de fluorescencia media geométrica (Media Geo) de la tinción de células anti-HER-3 mediante diluciones en serie de muestras de suero.

10

TABLA 2

Serie N° 3, XMG1					
ID Ratón	Dilución de la muestra	Después de 6 iny.		Después de 12 iny.	
		Media Geo células pos.	Media Geo células neg.	Media Geo células pos.	Media Geo células neg.
Q832-1	1:50	9	10	11	10
	1:250	6	9	6	6
	1:1250	6	7	4	4
Q832-2	1:50	8	10	29	42
	1:250	7	8	11	11
	1:1250	5	6	6	5
Q832-3	1:50	7	12	11	9
	1:250	5	7	5	5
	1:1250	5	5	4	4
Q832-4	1:50	6	10	9	9
	1:250	6	6	5	5
	1:1250	5	5	4	4
Q832-5	1:50	11	11	17	13
	1:250	10	9	7	6
	1:1250	6	8	5	4
Q832-6	1:50	7	11	15	14

ES 2 621 546 T3

Serie N° 3, XMG1					
ID Ratón	Dilución de la muestra	Después de 6 iny.		Después de 12 iny.	
		Media Geo células pos.	Media Geo células neg.	Media Geo células pos.	Media Geo células neg.
	1:250	7	7	7	6
	1:1250	5	6	6	4
Q832-7	1:50	8	11	7	15
	1:250	6	7	5	5
	1:1250	5	5	4	4
Q832-8	1:50	7	8	11	20
	1:250	6	6	7	8
	1:1250	5	5	5	4
Q832-9	1:50	7	12	15	16
	1:250	6	8	6	5
	1:1250	6	6	4	4
Q832-10	1:50	8	13	34	38
	1:250	6	8	9	8
	1:1250	6	6	5	4

TABLA 3

Serie N° 4, XMG4					
ID Ratón	Dilución de la muestra	Después de 6 iny.		Después de 12 iny.	
		Media Geo células pos.	Media Geo células neg.	Media Geo células pos.	Media Geo células neg.
Q856-1	1:50	4	6	91	44
	1:250	4	5	32	18
	1:1250	4	4	19	10
Q856-2	1:50	4	8	148	54
	1:250	4	5	89	23
	1:1250	4	4	42	9
Q856-3	1:50	4	5	72	14
	1:250	4	4	28	6
	1:1250	4	4	18	4
Q856-4	1:50	4	5	11	49
	1:250	4	5	10	17
	1:1250	4	4	8	7
Q856-5	1:50	4	4	74	20
	1:250	4	4	30	14
	1:1250	4	4	16	6
Q856-6	1:50	4	5	86	21
	1:250	4	4	32	10
	1:1250	4	4	16	5
Q856-7	1:50	5	6	74	32
	1:250	4	5	32	14

Serie N° 4, XMG4					
ID Ratón	Dilución de la muestra	Después de 6 iny.		Después de 12 iny.	
		Media Geo células pos.	Media Geo células neg.	Media Geo células pos.	Media Geo células neg.
	1:1250	4	4	16	6
Q856-8	1:50	4	5	106	14
	1:250	4	4	45	6
	1:1250	4	4	22	4
	1:50	5	6	53	22
Q856-9	1:250	4	4	17	11
	1:1250	4	4	11	5
	1:50	4	5	72	53
Q856-10	1:250	4	4	26	17
	1:1250	4	4	15	7

#### Ejemplo 4: Recuperación de linfocitos, aislamientos de células B, fusiones y generación de hibridomas

Se sacrificaron ratones inmunizados y se recogieron y se reunieron los nódulos linfáticos de cada serie. Las células linfoides se disociaron al triturar en DMEM para liberar las células de los tejidos, y las células se suspendieron en DMEM. Las células se contaron y se añadieron a la pella celular 0,9 ml de DMEM por 100 millones de linfocitos para resuspender las células suavemente pero completamente. Usando 100 µl de cuentas magnéticas CD90+ por 100 millones de células, las células se etiquetaron al incubar las células con las cuentas magnéticas a 4°C durante 15 min. La suspensión de células etiquetadas magnéticamente que contenía hasta  $10^8$  células positivas (o hasta  $2 \times 10^9$  células totales) se cargó en una columna LS+ y la columna se lavó con DMEM. El efluente total se recogió como la fracción negativa a CD90 (se esperaba que la mayoría de estas células fueran células B).

La fusión se realizó al mezclar células B enriquecidas lavadas de lo anterior y células P3X63Ag8.653 de mieloma no secretor adquiridas de ATCC (N° Cat. CRL 1580) (Kearney y cols, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550) en una relación de 1:1. La mezcla de células se aglomeró suavemente mediante centrifugación a 800 g. Después de la retirada completa del sobrenadante, las células se trataron con de 2 a 4 ml de solución de pronasa (CalBiochem, N° Cat. 53702; 0,5 mg/ml en PBS) durante no más de 2 min. A continuación, se añadieron de 3 a 5 ml de FBS para detener la actividad enzimática y la suspensión se ajustó hasta 40 ml de volumen total usando solución de electrofusión celular, ECFS (sacarosa 0,3 M, Sigma, N° Cat. S7903, acetato magnésico 0,1 mM, Sigma, N° Cat. M2545, acetato cálcico 0,1 mM, Sigma, N° Cat. C4705). El sobrenadante se retiró después de la centrifugación y las células se resuspendieron en 40 ml de ECFS. Esta etapa de lavado se repitió y las células se resuspendieron de nuevo en ECFS hasta una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml.

La electrofusión celular se realizó usando un generador de fusión, modelo ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego, CA. El tamaño de la cámara de fusión era 2,0 ml, usando los siguientes ajustes del instrumento: Condición de alineamiento: voltaje: 50 V, tiempo: 50 s; rotura de la membrana a: voltaje: 3000 V, tiempo: 30 µs; tiempo de reposo después de la fusión: 3 s.

Después de la ECF, las suspensiones celulares se retiraron cuidadosamente de la cámara de fusión bajo condiciones estériles y se transfirieron a un tubo estéril que contenía el mismo volumen de medio de cultivo de hibridomas (DMEM (JRH Biosciences), FBS al 15% (Hyclone), complementado con L-glutamina, pen/estrep, OPI (oxaloacetato, piruvato, insulina bovina) (todos de Sigma) e IL-6 (Boehringer Mannheim). Las células se incubaron durante de 15 a 30 min a 37°C y a continuación se centrifugaron a 400 g durante cinco min. Las células se resuspendieron suavemente en un pequeño volumen de medio de selección de hibridomas (medio de cultivo de hibridomas complementado con 0,5 x HA (Sigma, N° Cat. A9666)) y el volumen se ajustó apropiadamente con más medio de selección de hibridomas, basado en una siembra final de  $5 \times 10^6$  células B totales por placa de 96 pocillos y 200 µl por pocillo. Las células se mezclaron suavemente y se pipetearon en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer. El día 7 o 10, la mitad del medio se retiró y las células se realimentaron con medio de selección de hibridomas.

#### Ejemplo 5: Selección de posibles anticuerpos mediante ELISA

Después de 14 días de cultivo, un cribado primario de sobrenadantes de hibridoma de la serie N° 1 (los ratones de la serie uno se dividieron arbitrariamente en la fusión N° 1 y N° 2) con respecto a anticuerpos específicos para HER-3 se realizó mediante ELISA usando ECD de HER-3 etiquetado con his contracribando frente a una proteína etiquetada con his irrelevante mediante ELISA usando anti-hulgGfC-HRP de cabra (Caltag Inc., N° Cat. H10507, la concentración de uso era una dilución 1:2000) para detectar la unión de IgG humana a ECD de HER-3 inmovilizado sobre placas de ELISA. Los sobrenadantes de cultivo antiguos procedentes de los pocillos de crecimiento de células de hibridoma positivos basados en el cribado primario se retiraron y las células de hibridoma positivas a HER-3 se suspendieron con medio de cultivo de hibridomas reciente y se transfirieron a placas de 24 pocillos. Después de 2 días en cultivo, estos sobrenadantes estaban listos para un cribado de confirmación secundario. En el cribado de confirmación secundario para anticuerpos para IgGk completamente humanos específicos para HER-3, los positivos en el cribado primario se cribaron mediante ELISA con dos grupos de anticuerpos detective: anti-hulgGfC-HRP de cabra (Caltag Inc., N° Cat. H10507, la concentración de uso era 1:2000 de dilución) para la detección de la cadena gamma humana y anti-hlg kappa-HRP de cabra (Southern Biotechnology, N° Cat. 2060-05) para la detección de la cadena ligera kappa humana. Había 91 anticuerpos monoclonales específicos de IgG/kappa HER-3 completamente humanos que se generaban a partir de la serie N° 1.

#### Ejemplo 6: Selección de posibles anticuerpos mediante FMAT/FACS

Después de 14 días de cultivo, sobrenadantes de hibridoma procedentes de la serie N° 3 y N° 4 (fusión N° 3 y N° 4) se cribaron con respecto a anticuerpos monoclonales específicos para HER-3 mediante FMAT. En el cribado primario, sobrenadantes de hibridoma en una dilución final 1:10 se incubaron con células Rat1-Her3 que expresan HER-3 humano y 400 ng/ml de anticuerpo específico para Fc anti-IgG humana de F(ab)'2 conjugada a Cy5 (Jackson ImmunoResearch, N° Cat. 109-176-098) a temperatura ambiente durante 6 h. La unión de anticuerpos y complejo de anticuerpos de detección a las células se midió mediante FMAT (Applied Biosystems). La unión no específica de anticuerpos a las células se determinó mediante su unión a las células Rat1 parentales. Un total de 420 hibridomas que producen anticuerpos específicos para HER se seleccionó del cribado primario de la fusión N° 3. Los sobrenadantes procedentes de estos cultivos expandidos se probaron de nuevo usando el mismo protocolo de FMAT y se confirmó que 262 de ellos se unían a células que expresan HER-3 específicamente. Un total de 193 hibridomas que producen anticuerpo específicos para HER-3 se seleccionó del cribado primario de la fusión N° 4. Los sobrenadantes procedentes de estos cultivos expandidos se probaron mediante FACS y se confirmó que 138 de ellos se unían a células que expresan HER-3 específicamente. En el ensayo de confirmación por FACS, células Rat1-Xher3 y células Rat1 parentales (como control negativo) se incubaron con sobrenadantes de hibridoma con una dilución 1:2 durante 1 h a 40°C en PBS que contenía 2% de FBS. Después del lavado con PBS, la unión de los anticuerpos a las células se detectó mediante 2,5 µg/ml de anticuerpo específico para Fc anti-IgG humana de F(ab)'2 conjugada a Cy5 (JIRN° 109-176-098) y 5 µg/ml de anticuerpo específico de anti-kappa humana de F(ab)'2 de cabra conjugada a PE (SBN° 2063-09). Después de retirar los anticuerpos no unidos al lavar con PBS, las células se fijaron mediante cytofix (BDN° 51-2090KZ) con una dilución 1:4 y se analizaron mediante FACSCalibur.

#### Ejemplo 7: Selección de hibridomas para clonación

Anticuerpos de las series 1 y 2 se seleccionaron para la clonación de hibridomas basándose en la especificidad para HER-3 sobre HER1 (EGFR), HER-2 y HER-4 en ELISA usando dominios extracelulares recombinantes purificados disponibles de, por ejemplo, R&D Biosystems, y análisis basado en FACS de líneas celulares tumorales humanas que expresan diferentes miembros de la familia de HER, y un incremento de > 5 veces en la intensidad de fluorescencia media en la tinción con FACS de células positivas a HER-3 sobre un fondo. Basándose en estos criterios, se seleccionó un total de 23 líneas de hibridoma con respecto a la clonación mediante siembra celular con dilución limitativa.

Anticuerpos de las series 3 y 4 se seleccionaron con respecto a la clonación de hibridomas basándose en la especificidad para HER-3 sobre HER-1 (EGFR), HER-2 y HER-4 más otros tres criterios. El primer criterio era un cribado por ELISA con respecto a anticuerpos con epítomos contenidos dentro del dominio L2 de HER-3 (véase el Ejemplo "Análisis estructural de anticuerpos anti-HER-3 en la invención).

El segundo criterio era la neutralización de la unión de heregulina-alfa biotinilada a células que expresan HER-3 en un ensayo basado en FACS. Las células SKBR-3 se recogieron, se lavaron en medio de cultivo, se aglomeraron a través de centrifugación y se resuspendieron en medio de cultivo. Las células resuspendidas se dividieron en partes alícuotas en placas de 96 pocillos. Las placas se centrifugaron para aglomerar las células. Se añadieron anticuerpos de prueba en sobrenadantes de hibridoma agotados en 25µl/pocillo y se incubaron durante 1 h sobre hielo para permitir la unión del anticuerpo. Se añadieron 50 µl de una solución de heregulina-alfa 10 nM (R&D Biosystems, Minneapolis, MN) a cada pocillo para una concentración final de 5 nM y se incubaron sobre hielo durante 1,5 h. Las células se lavaron en 150 µl de PBS, se aglomeraron mediante centrifugación y el sobrenadante se retiró. Las células se resuspendieron en 50 µl de anticuerpo policlonal anti-HRG-alfa de cabra en 10 µg/ml y se incubaron durante 45 min sobre hielo. Las células se lavaron en 200 µl de PBS, se aglomeraron mediante centrifugación y el sobrenadante se retiró. Se añadieron 50 µl de una solución de anticuerpo policlonal contra inmunoglobulinas de cabra etiquetado con Cy5 de conejo en 5 µg/ml más 7AAD en 10 µg/ml y se incubaron sobre hielo durante 15 min.

Las células se lavaron en 200 µl de PBS, se aglomeraron mediante centrifugación y el sobrenadante se retiró. Las células se resuspendieron en 100 µl de tampón de FACS y se leyeron en el FACS. Los anticuerpos para HER-3 de prueba que reducían la unión de heregulina-alfa eran los que tenían la menor actividad fluorescente. Como controles positivos, se usaron diluciones en serie 1:5 desde 10.000 ng/ml hasta 16 ng/ml de un mAb para HER-3 de ratón (105.5) o el mAb para HER-3 de IgG1 humana, U1-49. Los controles negativos eran heregulina-alfa sola, células solas, anticuerpo policlonal anti-heregulina-alfa de cabra solo y anticuerpo policlonal contra inmunoglobulinas de cabra etiquetado con Cy5 de conejo solo.

El tercer criterio era la clasificación relativa con respecto a la afinidad y/o la intensidad de fluorescencia media relativa superior en FACS usando líneas celulares que expresan HER-3. La clasificación relativa con respecto a la afinidad se realizó al normalizar concentraciones de anticuerpo específico para HER-3 y presentan frente a los datos de ELISA de antígenos limitativo como sigue.

Normalización de concentraciones de anticuerpo específico para antígeno usando ELISA con alto contenido de antígeno

Usando un método de ELISA, los sobrenadantes para la concentración de anticuerpo específico de antígeno se normalizaron. Usando dos anticuerpos anti-IgG1 humana de HER-3 de la serie 1 de concentración conocida valorados en paralelo, se generó una curva estándar y la cantidad de anticuerpo específico de antígeno en los sobrenadantes de hibridoma de prueba procedentes de las series 3 y 4 se compararon con el estándar. DE este modo, se estimó la concentración de anticuerpo para IgG de HER3 humana en cada cultivo de hibridoma.

Se elaboraron placas de neutravidina al revestir neutravidina en 8 µg/ml en 1XPBS/azida sódica al 0,05% sobre placas de unión a medio Costar 3368 en 50 µl/pocillo con incubación durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se bloquearon con 1XPBS/leche desnatada al 1%. ECD de HER-3 etiquetado con his fotobiotinilado en 500 ng/ml en 1XPBS/leche desnatada al 1% se unió a las placas de neutravidina al incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. El sobrenadante de hibridoma, diluido en serie 1:2,5 desde una dilución de partida de 1:31 hasta una dilución final de 1:7568 en 1XPBS/leche desnatada al 1%/azida al 0,05%, se añadió en 50 µl/pocillo, y a continuación se incubó durante 20 horas a temperatura ambiente. Se usaron diluciones en serie para asegurar la obtención de lecturas de OD para cada valor desconocidos en el intervalo lineal del ensayo. Posteriormente, un anticuerpo de detección secundario, HRP anti Fc de IgG humana de cabra en 400 ng/ml en 1XPBS/leche desnatada al 1% se añadió en 50 µl/pocillo. Después de 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo 5 veces con agua y se añadieron a cada pocillo 50 µl de sustrato TMB de un componente. La reacción se detuvo después de 30 minutos mediante la adición de 50 µl de ácido clorhídrico 1 M a cada pocillo y las placas se leyeron a una longitud de onda de 450 nm. Se generó una curva estándar a partir de los dos mAb para HER-3 de IgG1 procedentes de la serie 1, diluidos en serie 1:2 desde 1000 ng/ml hasta 0,06 ng/ml y se ensayaron en un ELISA usando el protocolo anterior. Para cada valor desconocido, se usaron lecturas de OD en el intervalo lineal del ensayo para estimar la concentración de IgG de HER-3 humana en cada muestra.

El análisis de antígenos limitado es un método que clasifica por afinidad los anticuerpos específicos para antígeno en sobrenadantes de cultivo de células B con relación a otros anticuerpos específicos de antígeno. En presencia de un revestimiento muy bajo de antígeno, solo los anticuerpos de afinidad más alta serían capaces de unirse a cualquier nivel detectable en el equilibrio. (Véase, p. ej., la Publicación PCT WO/03048730A2 titulada "IDENTIFICATION OF HIGH AFFINITY MOLECULES BY LIMITED DILUTION SCREENING" publicada el 12 de junio de 2003). En este caso, dos mAb procedentes de la serie 1, ambos de concentración conocida y KD conocida, se usaron como puntos de referencia en el ensayo.

Se elaboraron placas de neutravidina al revestir neutravidina en 8 µg/ml en 1XPBS/azida sódica al 0,05% sobre placas de unión a medio Costar 3368 en 50 µl/pocillo con incubación durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se bloquearon con 1XPBS/leche desnatada al 1%. ECD de HER-3 etiquetado con his biotinilado se unió a placas de neutravidina de 96 pocillos en concentraciones: 125, 62,5, 31,2, 15,6 y 7,8 ng/ml en 1XPBS/leche desnatada al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Cada placa se lavó 5 veces con agua. Sobrenadantes de hibridoma diluidos 1:31 en 1XPBS/leche desnatada al 1%/azida al 0,05% se añadieron en 50 µl/pocillo. Después de 20 horas de incubación a temperatura ambiente en un agitador, las placas se lavaron de nuevo 5 veces con dH<sub>2</sub>O. Posteriormente, un anticuerpo de detección secundario, HRP (peroxidasa de rábano picante) anti Fc de IgG humana de cabra en 400 ng/ml en 1XPBS/leche desnatada al 1% se añadió en 50 µl/pocillo. Después de 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo 5 veces con dH<sub>2</sub>O y se añadieron a cada pocillo 50 µl de sustrato TMB de un componente. La reacción se detuvo después de 30 minutos mediante la adición de 50 µl de ácido clorhídrico 1 M a cada pocillo y las placas se leyeron a una longitud de onda de 450 nm. Las lecturas de OD de una concentración de antígeno que daba valores de OD en el intervalo lineal se usaron para el análisis de datos.

Representar los datos de antígeno altos, que estiman comparativamente la concentración de anticuerpo específico (véase anteriormente para los detalles), frente a la OD de antígeno limitada ilustra los anticuerpos de afinidad relativamente superior, p. ej., los que unidos tenían una OD superior en el ensayo con antígeno limitado mientras que tenían cantidades inferiores de anticuerpo para HER-3 de IgG en el sobrenadante.

Los hibridomas de las series 3 y 4 para los 33 anticuerpos que se comportan mejor en estos grupos de ensayo se adelantaron para la clonación mediante siembra de hibridomas con dilución limitativa.

5 Alternativamente, el análisis por FACS de la expresión de HER-3 de células of Rat/pLXSN y Rat/HER-3 mostraba resultados similares (sin reactividad cruzada con epítomos de rata endógenos) (Fig. 2).

10 Con detalle, se recogieron  $1 \times 10^5$  células con EDTA 10 mM en PBS, se lavaron una vez con tampón de FACS (PBS, FCS al 3%, azida al 0,4%) y se sembraron en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Las células se centrifugaron durante 3 min a 1000 rpm para retirar el sobrenadante y a continuación se resuspendieron con los anticuerpos de la familia HER específicos (3  $\mu\text{g/ml}$ ). Las suspensiones celulares se incubaron sobre hielo durante 45 min, se lavaron dos veces con tampón de FACS y se resuspendieron con anticuerpo secundario (100  $\mu\text{l/pocillo}$ ) anti-PE humana de burro (Jackson Immunoresearch, PA) diluido 1:50 en tampón de FACS. Las suspensiones celulares se incubaron sobre hielo y en la oscuridad durante 30 min, se lavaron dos veces con tampón de FACS y se analizaron (FACS, Beckman Coulter).

15 Ejemplo 8: Análisis estructural de anticuerpos anti-HER-3

20 En el siguiente análisis, se proporciona información estructural relativa a anticuerpos preparados según la invención. El contenido de la invención son anticuerpos como los definidos en las reivindicaciones, en particular el anticuerpo U1-59. Anticuerpos adicionales se proporcionan solamente como ejemplos comparativos. A fin de analizar estructuras de anticuerpos producidos según la presente invención, genes que codifican los fragmentos de la cadena pesada y ligera se amplificaron fuera del hibridoma particular. La secuenciación se efectuó como sigue:

25 Los transcritos de VH y VL se amplificaron de clones de hibridoma individuales en una placa de 96 pocillos usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Se aisló ARNm de poli(A)+ de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células de hibridoma usando un estuche Fast-Track (Invitrogen). Se pusieron en marcha cuatro reacciones de PCR para cada hibridoma: dos para la cadena ligera ( $\kappa$ ), y dos para la cadena pesada gamma ( $\gamma$ ). Se usó el estuche de PCR a temperatura ambiente QIAGEN OneStep para la amplificación (Qiagen, N° Catálogo 210212). En las reacciones de PCR a temperatura ambiente acopladas, se sintetizaron ADNc con una combinación de enzimas a temperatura ambiente (Omniscript y Sensiscript) usando el cebador de secuencia antisentido correspondiente a C- $\kappa$ , o a un consenso de las regiones CH1 de C y genes. La transcripción inversa se realizó a 50°C durante 1 h seguida por amplificación por PCR del ADNc mediante ADN polimerasa HotStarTaq para una alta especificidad y sensibilidad. Cada reacción de PCR usaba una mezcla de cebadores de sentido 5'; las secuencias de los cebadores se basaban en las secuencias líder de VH y VK disponibles en el cbersitio de Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>).

35 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo a 94°C durante 15 min, comienzo en caliente inicial seguido por 40 ciclos de 94°C durante 30 s (desnaturalización), 60°C durante 30 s (renaturalización) y 72°C durante 1 min (elongación).

Los productos de PCR se purificaron y se sometieron a secuenciación directamente usando cebadores de PCR directos e inversos usando el ABI PRISM BigDye terminator cycle sequencing ready reaction Kit (Perkin Elmer). Ambas hebras se sometieron a secuenciación usando estuches de secuenciación con terminador de colorante Prism y una máquina de secuenciación ABI 377.

40 Análisis de secuencias

45 Los análisis de las secuencias de ADNc de cadena pesada V y kappa V humanas de los anticuerpos para HER3 se efectuaron al alinear las secuencias de HER-3 con secuencias de cadena pesada V y kappa V de la línea germinal humana usando el software de diseño propio Abgenix (5AS). El software identificada la utilización del gen V, el gen D y el gen J así como inserciones nucleotídicas en las uniones de recombinación y mutaciones somáticas. También se generaron secuencias de aminoácidos informáticamente para identificar mutaciones somáticas. Se podrían obtener resultados similares con un software de análisis de secuencias disponible comercialmente e información disponible públicamente sobre la secuencia de los genes V, D y J humanos, p. ej., Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>).

Clonación molecular del mAb U1-59

50 Se extrajo ARN total del pocillo de cultivo tisular que contenía múltiples linajes de hibridomas, incluyendo el linaje de hibridoma que secreta el anticuerpo U1-59. Una región variable de la cadena pesada se amplificó usando cebadores específicos de la familia líderes 5', con cebador 3'-C-gamma. Una banda principal se amplificó usando un cebador VH4, sin que fueran visibles otras bandas. El fragmento VH4-34 gamma se clonó en el vector de expresión pCDNA en el marco con un gen de la región constante de gamma 1 humana.

55

Una región variable de la cadena pesada de IgM se amplificó usando cebadores específicos de la familia VH 5' con el cebador de la región constante mu 3'. Una banda principal se amplificó usando el cebador VH2, sin que fueran visibles otras bandas. El fragmento VH2-5 se clonó en el vector de expresión pCDNA en el marco con un gen de la región constante mu humano. Las cadenas kappa V se amplificaron y se sometieron a secuenciación. Se identificaron cuatro productos de RT-PCR de la cadena kappa. Los productos se sometieron a secuenciación y después del análisis de secuencias a través de traducción informática, solo tres de ellos tenían marcos de lectura abierta. Estas tres cadenas kappa funcionales se clonaron fuera del hibridoma U1-59 oligoclonal bien identificado basándose en la utilización del gen V kappa como (1) VK1 A3-JK2, (2) VK1 A20-JK3 y (3) B3-JK1. Todas las V-kappa se clonaron en el vector de expresión pCDNA en el marco con el gen de la región constante de la cadena ligera kappa humana.

Transfecciones:

Cada cadena pesada se transfectó con cada una de las cadenas kappa en transfecciones transitorias para un total de 6 pares de cadena pesada/cadena ligera kappa. La transfección de la cadena gamma con la cadena kappa A20 daba escasa expresión de anticuerpo, mientras que no se secretaba o detectaba anticuerpo cuando la cadena kappa A20 se cotransfectaba con la cadena mu. Un total de tres IgG sups y dos IgM sups estaba disponible para la unión a HER-3.

Cadena	VH	D	J	Constante	ORF
Pesada	VH4-34	D1-20	JH2	Gamma	sí
Pesada	VH2-5	D6-6	JH4b	Mu	sí
Ligera	A3		JK2	Kappa	sí
Ligera	A20		JK3	Kappa	sí
Ligera	B3		JK1	Kappa	sí
Ligera	A27		JK3	Kappa	NO

La actividad de unión a líneas celulares HER-3+ se detectó en FACS con el mAb de IgG1 que consistía en la cadena VH4-34 y la B3 kappa. Ninguna de las otras combinaciones VH/Vk daban señal de fluorescencia por encima del fondo en FACS usando líneas celulares HER-3+.

Competición de unión de los anticuerpos anti-HER-3

Se realizó una compartimentación de anticuerpos competitiva múltiple según se publica en Jia y cols. J Immunol Methods. 288, 91-98 (2004) para determinar aglomerados de anticuerpos para HER-3 que competían con respecto a la unión a HER-3. Los anticuerpos para HER-3 probados de la serie 1 se aglomeraban en 5 compartimentos basándose en la competición con respecto a la unión.

Compartimento N° 1	Compartimento N° 2	Compartimento N° 3	Compartimento N° 4	Compartimento N° 5
U 1-42	U1-48	U1-52	U1-38	U1-45
U 1-44	U1-50		U1-39	U1-40
U1-62	U1-51			U1-41
U1-46				U1-43
U1-47	U1-49			U1-61
U1-58				U1-53
				U1-55

Caracterización epitópica de anticuerpos anti-HER-3

Los epitopos de anticuerpos anti-HER-3 humanos se caracterizaron. En primer lugar, un análisis de transferencia de gota de la proteína de ECD purificada etiquetada con HER-3-His desnaturalizada reducida mostraba ausencia de unión mediante los anticuerpos anti-HER-3 probados (U1-59, U1-61, U1-41, U1-46, U1-53, U1-43, U1-44, U1-47, U1-52, U1-40, U1-49)) demostrando que todos tenían epitopos sensibles a la reducción de enlaces disulfuro, sugiriendo que todos tenían epitopos discontinuos. Posteriormente, los anticuerpos se cartografiaron a dominios

definidos en la molécula de HER-3 al manipular diversas moléculas quiméricas de HER-3 de ser humano-rata, basándose en la división del dominio extracelular de HER-3 en cuatro dominios:

1) L1 (D1): el dominio secundario de unión a ligando,

2) S1 (D2): el primer dominio rico en cisteína,

5 3) L2 (D3): el principal dominio de unión a ligando, y

4) S2 (D4): el dominio secundario rico en cisteína.

10 El dominio extracelular (ECD) de ADNc de HER-3 humano se amplificó a partir de células RAT1-HER-3. Los ADNc de HER-3 de rata se amplificaron mediante RT-PCR a partir de ARN de hígado de rata y se confirmaron mediante secuenciación. Los ADNc que expresan el ECD de Her3 humano y de rata se clonaron en vectores de expresión de mamífero como proteínas de fusión V5-His. Los dominios procedentes del ECD de HER-3 humano se intercambiaron en el andamiaje proporcionado por el ECD de HER-3 de rata al usar los sitios de restricción internos Mfe1, BstX1 y DraIII. Por este medio, diversas proteínas de fusión de ECD de HER-3 HIS de rata/ser humano quiméricas (aminoácidos 1-160, 161-358, 359-575, 1-358, 359-604) se construyeron y se expresaron a través de transfección transitoria de células HEK 293T. La expresión de las construcciones se confirmó usando un anticuerpo policlonal de rata contra HER-3 humano. Los anticuerpos monoclonales humanos se probaron en ELISA con respecto a la unión a los ECD quiméricos secretados.

15 Dos de los anticuerpos humanos, incluyendo el anticuerpo U1-59, reaccionaban cruzadamente con HER-3 de rata. Para asignar dominios de unión, estos mAb se probaron contra una forma truncada de HER-3 que consistía en proteína etiquetada con L1-S1-V5his purificada del sobrenadante de células HEK 293T transfectadas con un ADN plasmídico que codifica la expresión de los dominios extracelulares L1-S1 de HER3. El mAb U1-59 se une a la proteína de L1-S1 en ELISA, implicando que su epítipo está en L1-S1. El mAb 2.5.1 no se unía a la proteína de L1-S1, implicando que su epítipo está en L2-S2. Se efectuó una cartografía adicional del anticuerpo U1-59 usando espectroscopía de masas de tiempo de vuelo SELDI con digestos proteolíticos sobre chip de complejos de mAb-ECD de HER-3.

25 Cartografía de epítipos de U1-59 usando SELDI

30 La cartografía adicional del anticuerpo U1-59 se efectuó usando una espectroscopía de tiempo de vuelo SELDI con digestos proteolíticos sobre chip de complejos de mAb-ECD de HER-3. La proteína A se unía covalentemente a una micromatriz de proteína PS20 y se usó para capturar el mAb U1-59. A continuación, el complejo del chip de proteína PS20 y el anticuerpo monoclonal se incubó con antígeno purificado para HER-3-His. Posteriormente, el complejo anticuerpo-antígeno se digirió con una alta concentración de Asp-N. El chip se lavó, dando como resultado una retención solamente del péptido de HER-3 unido al anticuerpo sobre el chip. El epítipo se determinó mediante SELDI y se identificó por la masa del fragmento. El fragmento de 6814 D identificado corresponde a dos posibles péptidos esperados generados a partir de un digesto parcial del ECD de HER-3-his. Ambos péptidos solapados se cartografiaron al dominio S1. Al acoplar los resultados de SELDI con la unión a una construcción con eliminación de HER-3, el epítipo se cartografió a los residuos 251 a 325.

35 La localización de los dominios de unión en la parte extracelular de HER-3 que son reconocidos por los mAb anti-HER-3 humanos de la invención se resume en la Tabla 4. Los resultados de la cartografía de los dominios epitépicos eran coherentes con los resultados de compartimentos de competición de unión a anticuerpos, con anticuerpos que competían cruzadamente entre sí con respecto a la unión a HER-3 que también se cartografiaban hasta los mismos dominios en HER-3 (Fig. 3).

45 TABLA 4

Un resumen del dominio de unión de mAb basado en los resultados del ensayo ELISA					
mAb	XR de rata	Dominio de unión	mAb	XR de rata	Dominio de unión
U 1-59	Sí	S1	U1-2	No	L2
U1-61	No	L2	U1-7	No	L2
U1-41	No	L2	U1-9	No	L2
U1-46	No	S1	U1-10	No	L2
U1-53	No	L2	U1-12	No	L2

Un resumen del dominio de unión de mAb basado en los resultados del ensayo ELISA					
mAb	XR de rata	Dominio de unión	mAb	XR de rata	Dominio de unión
U1-43	No	L2	U1-13	No	L2
U 1-44	No	S1	U1-14	No	L2
U1-47	No	S1	U1-15	No	L2
U 1-52	Sí	L2S2	U1-19	No	L2
U1-40	No	L2	U1-20	No	L2
U1-49	No	L1	U1-21	No	L2
U1-21	No	L2	U1-28	No	L2
U1-22	No	L2	(U1-31)	No	L2
U1-23	No	L2	U1-32	No	L2
U 1-24	No	L2	(U1-35)	No	L2
U1-25	No	L2	U1-36	No	L2
U1-26	No	L2	(U1-37)	No	L2
U1-27	No	L2			

XR = reactivo cruzadamente

#### Ejemplo 9: Determinación de clases canónicas de anticuerpos

5 Chothia y cols. han descrito la estructura de los anticuerpos en lo relativo a "clases canónicas" para las regiones hipervariable de cada cadena de inmunoglobulina (J. Mol. Biol., 20 de agosto de 1987, 196(4):901-17). Las estructuras atómicas de los fragmentos Fab y VL de una variedad de inmunoglobulinas se analizaron para determinar la relación entre sus secuencias de aminoácidos y las estructuras tridimensionales de sus sitios de unión a antígeno. Chothia y cols. encontraron que había relativamente pocos residuos que, a través de su unión por enlaces de hidrógeno con empaquetamiento o la capacidad para asumir conformaciones phi, psi u omega inusuales, fueran fundamentalmente responsables de las conformaciones de la cadena principal de las regiones hipervariables. Se encontró que estos residuos se presentaban en sitios dentro de las regiones hipervariables y en el armazón de lámina  $\beta$  conservado. Al examinar secuencias de inmunoglobulinas que tienen estructura desconocida, Chothia y cols. muestran que muchas inmunoglobulinas tienen regiones hipervariables que son similares en tamaño a una de las estructuras conocidas y residuos idénticos adicionalmente contenidos en los sitios responsables de la conformación observada.

15 Su descubrimiento implicaba que estas regiones hipervariables tienen conformaciones cercanas a las de estructuras conocidas. Para cinco de las regiones hipervariables, el repertorio de conformaciones parecía estar limitado a un número relativamente pequeño de clases estructurales discretas. Estas conformaciones de la cadena principal comúnmente presentes de las regiones hipervariables se denominaron "estructuras canónicas". Un trabajo adicional de Chothia y cols. (Nature, 21-28 de diciembre de 1989, 342(6252):877-83) y otros (Martin, y cols. J. Mol. Biol., 15 de noviembre de 1996, 263(5):800-15) confirmaban que hay un pequeño repertorio de conformaciones de la cadena principal para al menos cinco de las seis regiones hipervariables de los anticuerpos.

25 Las CDR de cada anticuerpo descrito anteriormente se analizaron para determinar su clase canónica. Como se sabe, las clases canónicas solo han sido asignadas para CDR1 y CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo, junto con CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo. Las tablas posteriores resumen los resultados del análisis. Los datos de las clases canónicas están en la forma de HCDR1-HCDR2-LCDR1-LCDR2-LCDR3, en donde "HCDR" se refiere a la CDR de la cadena pesada y "LCDR" se refiere a la CDR de la cadena ligera. Así, por ejemplo, una clase canónica de 1-3-2-1-5 se refiere a un anticuerpo que tiene una HCDR1 que está dentro de la clase canónica 1, una HCDR2 que está dentro de la clase canónica 3, una LCDR1 que está dentro de la clase canónica 2, una LCDR2 que está dentro de la clase canónica 1 y una LCDR3 que está dentro de la clase canónica 5.

35 Las asignaciones se hicieron a una clase canónica particular en la que había 70% o más de identidad de los aminoácidos en el anticuerpo con los aminoácidos definidos para cada clase canónica. Los aminoácidos definidos para cada anticuerpo se pueden encontrar, por ejemplo, en los artículos de Chothia y cols. mencionados anteriormente. La Tabla 5 y la Tabla 6 presentan los datos de las clases canónicas para cada uno de los anticuerpos para HER-3. Cuando hay menos de 70% de identidad, la asignación a la clase canónica está marcada con un asterisco ("\*") para indicar que se realizaba la mejor estimación de la clase canónica apropiada, basándose en la longitud de cada CDR y la totalidad de los datos. Cuando no existía una clase canónica coincidente con la misma

40

longitud de CDR, la asignación de la clase canónica se marca con una letra s y un número, tal como "s18", significando que la CDR es de tamaño 18. Cuando no existían datos de secuencia disponibles para una de las cadenas pesada y ligera, la clase canónica se marca con "Z".

5

TABLA 5

Anticuerpo (clasificado)	H1-H2-L1-L2-L3	Longitud de H3	Anticuerpo (clasificado)	H1-H2-L1-L2-L3	Longitud de H3
U1-38	3-1-4-1-1	9	U1-7	3-1-2-1-1	12
U1-39	1-1-4-1*-1	6	U1-9	3-1-2-1-1	12
U1-40	3-1-4-1-1	15	U1-10	3-1-2-1-1	12
U1-41	3-1-2-1-1	15	U1-12	3-1-2-1-1	12
U1-42	1-2-2-1-1	9	U1-13	3-1-4-1-1	7
U1-43	3-1-2-1-1	17	U1-14	3-1-2-1-1	12
U 1-44	1-2-2-1-1	9	U1-15	3-1-8-1-1	14
U1-45	1-2*-2-1-1	16	U1-19	3-1-Z-Z-Z	12
U1-46	3-s18-Z-Z-Z	17	U1-20	3-1-2-1-1	19
U1-47	3-s18-2-1-1	16	U1-21	3-1-2-1-1	12
U1-48	1-1-Z-Z-Z	16	U1-22	3-1-2-1-1	12
U1-49	1-3-4-1-1	17	U1-23	3-1-2-1-1	12
U1-50	3-1-2-1-1	17	U1-24	3-1-2-1-1	12
U1-51	1-1-3-1-1	19	U1-25	3-1-2-1-1	12
U1-52	3-1-8-1-1	15	U1-26	3-1-2-1-1	12
U1-53	1-3-2-1-1	10	U1-27	3-1-2-1-1	12
U1-55	3-1-4-1-1	15	U1-28	3-1-2-1-1	12
U1-57	3-1-4-1-1	15	U1-31	1-2-2-1-1	13
U1-58	1-3-2-1-1	12	U1-32	3-1-2-1-1	12
U1-59	1-1-3-1-1	9	U1-35	1-3-2-1-1	14
U1-61.1	3-1*-2-1-1	16	U1-36	3-1-2-1-1	12
U1-62	1-2-8-1-1	12	U1-37	1-2-Z-Z-Z	13
U1-2	3-1-2-1-1	12			

10

La Tabla 7 es un análisis del número de anticuerpos por clase. El número de anticuerpos que tienen la clase canónica particular indicada en la columna de la izquierda se muestra en la columna de la derecha. Los cuatro mAb que carecen de datos de secuencia de una cadena y que tienen así "Z" en la asignación canónica no se incluyen en este recuento.

15

La estructura más comúnmente observada es 3-1-2-1-1: Veintiuno de cuarenta y un mAb que tienen secuencias de cadenas tanto pesada como ligera tenían esta combinación.

TABLA 6

H1-H2-L1-L2-L3	Recuento
1-1-3-1-1	2
1-1-4-1*-1	1
1-2-2-1-1	4
1-2-8-1-1	1
1-3-2-1-1	3
1-3-4-1-1	1
3-1-2-1-1	21
3-1-4-1-1	5

H1-H2-L1-L2-L3	Recuento
3-1-8-1-1	2
3-s18-2-1-1	1

#### Ejemplo 10: Determinación de la afinidad de los anticuerpos

Se realizaron medidas de afinidad de anticuerpos anti-HER-3 mediante análisis de Scatchard por FACS indirecta. Por lo tanto,  $10^5$  células de interés o células SK-Br 3 se recogieron con EDTA 10 mM en PBS, se lavaron una vez con tampón de FACS (PBS, FCS al 3%, azida al 0,4%) y se sembraron en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Las células se centrifugaron durante 3 min a 1000 rpm para retirar el sobrenadante y a continuación se resuspendieron con anticuerpo para  $\alpha$ -HER-3 (3  $\mu$ g/ml) o con diluciones de anticuerpo (100  $\mu$ l/pocillo) partiendo de 20  $\mu$ g/ml de anticuerpo monoclonal humano en tampón de FACS, diluido en etapas de dilución 1:2. Las suspensiones celulares se incubaron sobre hielo durante 1 h, se lavaron dos veces con tampón de FACS y se resuspendieron con anticuerpo secundario (100  $\mu$ l/pocillo) anti-PE humana de burro (Jackson) diluido 1:50 en tampón de FACS. Las suspensiones celulares se incubaron sobre hielo y en la oscuridad durante 30 min, se lavaron dos veces con tampón de FACS y se analizaron (FACS, Beckman Coulter). Según el análisis de Scatchard por FACS, la media de fluorescencia se calculó para cada medida. La tinción de fondo (= sin el 1<sup>o</sup> anticuerpo) se sustrajo de cada media de fluorescencia. Se generó una gráfica de Scatchard con valor  $x$  = media de fluorescencia y el valor  $y$  = media de fluorescencia/concentración de mAb (nM). La KD se tomó como el valor absoluto de  $1/m$  de la ecuación lineal. La Fig. 4 muestra un análisis cinético que usa el anticuerpo U1-59 de la invención. En la tabla 8 siguiente, se proporcionan medidas de afinidad para ciertos anticuerpos seleccionados de este modo.

TABLA 7

clon	KD (nM)
U1-38	n.d.
U1-39	102
U1-40	6,7
U1-41	0,18
U1-42	n.d.
U1-43	0,57
U1-44	4
U1-52	16,8
U1-61	0,13
U1-62	20,4
U1-46	13,8
U1-47	9,38
U1-49	1
U1-50	39,3
U1-51	131,6
U1-53	0,082
U1-55.1	3,7
U1-58	6,4
U1-59	3,69
U 1-24	0,06
U1-7	0,02

Ejemplo 11: Los anticuerpos anti-HER-3 inducen la endocitosis del receptor HER-3

5 El HER-3 se ha identificado como un factor que puede influir en el inicio y el avance de enfermedades hiperproliferativas a través de servir como un importante "portero" de la señalización celular mediada por la familia HER. Así, si HER-3 es depurado eficazmente de la superficie celular/membrana por la internalización del receptor, la señalización celular y por lo tanto la transformación y/o el mantenimiento de células en una enfermedad maligna se puede disminuir o suprimir finalmente.

10 A fin de investigar si los anticuerpos anti-HER-3 de la invención y anticuerpos comparativos son capaces de inducir la endocitosis acelerada de HER-3, se comparará la cantidad relativa de moléculas de HER-3 sobre la superficie celular después de 0,5 y 4 h de incubación de las células con anticuerpos anti-HER-3 de la invención. Se sembraron  $3 \times 10^5$  células en medio de crecimiento normal en un plato de 24 pocillos y se dejó crecer durante la noche. Las células se preincubaron con 10  $\mu\text{g/ml}$  de mAb anti-HER-3 en medio de crecimiento normal para los tiempos indicados a 37°C. Las células se separaron con EDTA 10 mM y se incubaron con 10  $\mu\text{g/ml}$  de mAb anti-HER-3 en tampón de lavado (PBS, FCS al 3%, azida al 0,04%) durante 45 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con tampón, se incubaron con anticuerpo secundario anti-PE humana de burro (Jackson) diluido 1:100 durante 45 min a 4 °C, se lavaron dos veces con tampón de lavado y se analizaron mediante FACS (BeckmanCoulter, EXPO).

20 Los datos mostrados en la Fig. 5 demuestran que el tratamiento de células con anticuerpos anti-HER-3 conduce a la internalización del receptor. Los datos se muestran como % de internalización y se refieren a la reducción de la intensidad de fluorescencia media de muestras tratadas con anti-HER3 con relación a muestras tratadas con control.

25 Ejemplo 12: Inhibición de la unión de ligandos a células cancerosas humanas SKBr3 por anticuerpos anti-HER-3 humanos

Se realizaron experimentos de competición de radioligandos a fin de cuantificar la capacidad de los anticuerpos anti-HER-3 de la invención y anticuerpos comparativos para inhibir la unión de ligandos a HER-3 en un ensayo basado en células. Por lo tanto, el ensayo de unión al receptor HER-3 se realizó con  $4 \times 10^5$  células SK-BR-3 que se

incubaban con concentraciones variables de anticuerpos durante 30 min sobre hielo. Se añadieron [ $^{125}$ I]- $\alpha$ -HRG/[ $^{125}$ I]- $\beta$ -HRG 1,25 nM a cada pocillo y la incubación se continuó durante 2 h sobre hielo. Las placas se lavaron cinco veces, se secaron al aire y se recontaron en un contador de centelleo. Las Figs. 6a-e muestran los resultados de estos experimentos realizados con anticuerpos anti-HER-3 representativos y demuestran que el anticuerpo U1-59 de la invención es capaz de reducir específicamente la unión de [ $^{125}$ I]- $\alpha$ -HRG/[ $^{125}$ I]- $\beta$ -HRG a células que expresan HER-3 endógeno.

Ejemplo 13: Inhibición de la fosforilación de HER-3 inducida por ligando mediante anticuerpos anti-HER-3 humanos

Se realizaron experimentos de ELISA a fin de investigar si los anticuerpos de la invención y los anticuerpos comparativos son capaces de bloquear la activación de HER-3 mediada por el ligando  $\beta$ -HRG -3. La activación de HER-3 mediada por ligando se detectó mediante una fosforilación incrementada de tirosina receptora.

Día 1: 1 x disco de 96 pocillos se revistió con 20  $\mu$ g/ml de colágeno I en ácido acético 0,1 M durante 4 h a 37°C. Se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células en medio de crecimiento normal

Día 2: Las células se sometieron a ayuno en 100  $\mu$ l de medio libre de suero durante 24 h.

Día 3: Las células se preincubaron con 10  $\mu$ g/ml de mAb anti-HER-3 durante 1 h a 37°C y a continuación se trataron con 30 ng/ml de dominio  $\beta$ -HRG-EGF (R&D Systems) durante 10 min. El medio se sacudió y las células se fijaron con solución de formaldehído al 4% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. La solución de formaldehído se retiró y las células se lavaron con tampón de lavado (PBS/Tween 20 al 0,1%). Las células se desactivaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1%, NaN<sub>3</sub> al 0,1% en tampón de lavado y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente, a continuación se bloquearon con NET-gelatina durante 5 h a 4°C. El anticuerpo primario fosfo-HER-3 (Tyr1289) (conejo policlonal; Señalización celular N° 4791; 1:300) se añadió durante la noche a 4°C.

Día 4: La placa se lavó 3 veces con tampón de lavado, a continuación se incubó con anti-POD de conejo diluido 1:3000 en PBS – se añadió BSA al 0,5% a cada pocillo y se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3x con tampón de lavado y una vez con PBS. Se añadió tetrametilbencidina (TMB, Calbiochem) y se comprobó a 650 nm. La reacción se detuvo mediante la adición de 100  $\mu$ l de HCl 250 nM y la absorbancia se leyó a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 650 nm usando un lector de placas Vmax (Thermo Lab Systems).

La Fig. 7a muestra resultados representativos de este experimento, que demuestran que los anticuerpos anti-HER-3 eran capaces de reducir la activación de HER-3 medida por ligando según se indicaba por la disminución de la fosforilación de la tirosina receptora. Los datos se muestran como porcentaje de reducción mediante anticuerpos terapéuticos con relación al anticuerpo de control.

Para probar la potencia del mAb U1-53 para inhibir la activación de HER-3 inducida por ligando, células MCF-7 se sometieron a ayuno durante 24 h, se incubaron con mAb U1-53 durante 1 h a 37°C y se estimularon con HRG- $\beta$  10 nM durante 10 min. Los lisados se transfirieron a placas de ELISA 1 B4 (mAb anti-HER-3 de ratón) y la fosforilación de HER-3 se analizó con anticuerpo 4G10. Según se muestra en la Fig. 7b, la fosforilación de HER-3 se inhibía casi completamente de un modo dependiente de la dosis con una IC<sub>50</sub> de 0,14 nM.

Ejemplo 14: Inhibición de la fosforilación de p42/p44 MAP-cinasa inducida por ligando mediante anticuerpos anti-HER-3 humanos

Posteriormente, se realizaron experimentos de ELISA a fin de investigar si los anticuerpos de la invención y los anticuerpos comparativos son capaces de bloquear la activación de p42/p44 MAP-cinasa medida por el ligando  $\beta$ -HRG. La activación de HER-3 mediada por ligando se detectó mediante un incremento en la fosforilación de proteína (Thr202/Tyr204).

Día 1: 1 x plato de 96 pocillos se revistió con 20  $\mu$ g/ml de colágeno I en ácido acético 0,1 M durante 4 h a 37°C. Se sembraron  $3 \times 10^5$  células en medio de crecimiento normal

Día 2: Las células se sometieron a ayuno en 100  $\mu$ l de medio libre de suero durante 24 h.

Día 3: Las células se preincubaron con 5  $\mu$ g/ml de mAb anti-HER-3 durante 1 h a 37°C y a continuación se trataron con 20 ng/ml de dominio  $\beta$ -HRG-EGF (R&D Systems) durante 10 min. El medio se sacudió y las células se fijaron con solución de formaldehído al 4% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. La solución de formaldehído se retiró y las células se lavaron con tampón de lavado (PBS/Tween 20 al 0,1%). Las células se desactivaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1%, NaN<sub>3</sub> al 0,1% en tampón de lavado y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente, a continuación se bloquearon con PBS/BSA al 0,5% durante 5 h a 4°C. Se añadió durante la noche a 4°C el anticuerpo primario fosfo-p44/p42 MAP cinasa (Thr202/Tyr204) (conejo policlonal; Señalización celular N° 9101; 1:3000).

Día 4: La placa se lavó 3 veces con tampón de lavado, a continuación se incubó con anti-HRP de conejo diluido 1:5000 en PBS – se añadió BSA al 0,5% a cada pocillo y se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3x con tampón de lavado y una vez con PBS. Se añadió tetrametilbencidina (TMB, Calbiochem) y se comprobó a 650 nm. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de HCl 250 nM y la absorbancia se leyó a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 650 nm usando un lector de placas Vmax (Thermo Lab Systems).

La Fig. 8 muestra resultados representativos de este experimento. Los anticuerpos de la invención eran capaces de reducir la activación de p42/p44 MAP-cinasa mediada por ligando según se indica por una disminución de la fosforilación. Los datos se muestran como porcentaje de reducción por anticuerpos terapéuticos con relación a un anticuerpo de control.

Ejemplo 15: Inhibición de la fosforilación de fosfo-AKT inducida por β-HRG mediante anticuerpos anti-HER-3 humanos

En el siguiente experimento de ELISA, se investigó si los anticuerpos anti-HER-3 de la invención y los anticuerpos comparativos son capaces de bloquear la activación de AKT-cinasa mediada por el ligando β-HRG. La activación de AKT mediada por ligando se detectó mediante un incremento en la fosforilación de proteína (Ser473).

Día 1: 1 x plato de 96 pocillos se revistió con 20 µg/ml de colágeno I en ácido acético 0,1 M durante 4 h a 37°C. Se sembraron 3x10<sup>5</sup> células en medio de crecimiento normal

Día 2: Las células se sometieron a ayuno en 100 µl de medio libre de suero durante 24 h.

Día 3: Las células se preincubaron con 5 µg/ml de mAb anti-HER-3 durante 1 h a 37°C y a continuación se trataron con 20 ng/ml de dominio β-HRG-EGF (R&D Systems) durante 10 min. El medio se sacudió y las células se fijaron con solución de formaldehído al 4% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. La solución de formaldehído se retiró y las células se lavaron con tampón de lavado (PBS/Tween 20 al 0,1%). Las células se desactivaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1%, NaN<sub>3</sub> al 0,1% en tampón de lavado y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente, a continuación se bloquearon con PBS/BSA al 0,5% durante 5 h a 4°C. Se añadió durante la noche a 4°C el anticuerpo primario fosfo-Akt (Ser473) (conejo policlonal; Señalización celular N° 9217; 1:1000).

Día 4: La placa se lavó 3 veces con tampón de lavado, a continuación se incubó con anti-HRP de conejo diluido 1:5000 en PBS – se añadió BSA al 0,5% a cada pocillo y se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3x con tampón de lavado y una vez con PBS. Se añadió tetrametilbencidina (TMB, Calbiochem) y se comprobó a 650 nm. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de HCl 250 nM y la absorbancia se leyó a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 650 nm usando un lector de placas Vmax (Thermo Lab Systems).

La Fig. 9 muestra resultados representativos de este experimento. Los anticuerpos anti-HER-3 de la invención eran capaces de reducir AKT mediada por β-HRG según se indica por una disminución en la fosforilación. Los datos se muestran como porcentaje de reducción por anticuerpos terapéuticos con relación a un anticuerpo de control.

Ejemplo 16: Inhibición de la proliferación de células MCF7 mediada por α-HRG/β-HRG mediante anticuerpos anti-HER-3 humanos

Se efectuaron experimentos in vitro a fin de determinar la capacidad de los anticuerpos de la invención y los anticuerpos comparativos para inhibir la proliferación celular estimulada por HRG. Se sembraron 2000 células MCF7 en medio que contenía FCS sobre placas de 96 pocillos durante la noche. Las células se preincubaron por cuadruplicado con anticuerpo diluido en medio con FCS al 0,5% durante 1 h a 37°C. Las células se estimularon con 30 ng/ml de α- o 20 ng/ml de β-HRG (R&D Systems) al añadir ligando directamente a solución de anticuerpo y se dejaron crecer durante 72 h. Se añadió AlamarBlue™ (BIOSOURCE) y se incubó a 37°C en la oscuridad. La absorbancia se midió a 590 nm cada 30 min. Los datos se tomaron 90 min después de la adición de alamar blue. Los resultados que se indican en la Fig. 10 muestran que los anticuerpos inhiben el crecimiento celular inducido por HRG en células cancerosas humanas. Los datos se muestran como porcentaje de reducción por anticuerpos terapéuticos con relación a un anticuerpo de control..

Ejemplo 17: Inhibición de la migración de células MCF7 inducida por β-HRG mediante anticuerpos anti-HER-3 humanos

Se realizaron experimentos de trans migración a fin de investigar si los anticuerpos de la invención y los anticuerpos comparativos bloquean la migración celular. Células MCF7 privadas de suero se preincubaron al añadir la cantidad indicada de anticuerpo a la suspensión celular e incubar ambos durante 45 min a 37°C. A continuación, 500 µl de suspensión celular (50.000 células) se pusieron en la cámara superior de trans pocillos revestidos con colágeno I (BD

Falcon, poros de 8 µm). Se usaron en la cámara de fondo 750 µl de medio (MEM, aminoácidos, piruvato Na, pen.-estrep., BSA al 0,1%, sin suero de ternero fetal) solos o que contenían los ligandos dominio β-HRG-EGF (R&D Systems). Las células se dejaron migrar durante 8 h a 37°C y se tiñeron con DAPI.

5 Los núcleos teñidos se contaron manualmente; el porcentaje de inhibición se expresó como la inhibición relativa a un anticuerpo de control.

La Fig. 11 muestra el resultado del experimento que demuestra que los anticuerpos anti-HER-3 reducen la migración celular inducida por HRG.

Ejemplo 18: Ensayo de formación de colonias (ensayo en agar blando)

10 Se efectuaron ensayos en agar blando a fin de investigar la capacidad de los anticuerpos anti-HER-3 de la invención para inhibir el crecimiento celular independiente del anclaje. El ensayo de formación de colonias en agar blando es un ensayo in vitro estándar para probar células transformadas, ya que solamente tales células transformadas pueden crecer en agar blando.

15 Se preincubaron de 750 a 2000 células (dependiendo de la línea celular) con los anticuerpos indicados a 10 µg/ml en medio IMDM (Gibco) durante 30 min y se resuspendieron en agar noble de Difco al 0,4%. La suspensión celular se sembró sobre una subcapa de agarosa al 0,75% que contenía FCS al 20% por cuadruplicado en una placa de 96 pocillos. Se dejó que se formaran colinas durante 14 días y a continuación se tiñeron con 50 µl de MTT (0,5 mg/ml en PBS) durante la noche. Las Figs. 12a-i muestran los resultados de estos experimentos realizados con tres anticuerpos. Estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-HER-3 reducen el crecimiento celular independiente del anclaje de células de cáncer de mama MDA-MB361 y NCI-ADR (Fig. 12a,b), cáncer gástrico MKN-28 (Fig. 12c), células de melanoma HT144 (Fig. 12d), células de carcinoma ovárico Skov3 (Fig. 12e), células de cáncer de próstata PPC-1 (Fig. 12f), células de cáncer de páncreas BX-PC3 (Fig. 12g), células de carcinoma epidermoide A431 (Fig. 12h) y células de carcinoma pulmonar (Fig. 12i). Las colonias se contaron con un sistema de cámara Scanalyzer HTS (Lemnatec, Wuerselen).

25 Ejemplo 19: Los anticuerpos anti-HER-3 humanos inhiben el crecimiento de carcinoma de mama humano en ratones atímicos

La eficacia antitumoral de los anticuerpos terapéuticos se evalúa a menudo en estudios de tumores xenoinjertados humanos. En estos estudios, tumores humanos crecen como xenoinjertos en ratones inmunocomprometidos y la eficacia terapéutica se mide mediante el grado de inhibición del crecimiento tumoral. A fin de determinar si los anticuerpos anti-HER-3 de la invención y los anticuerpos comparativos interfieren con el crecimiento tumoral de células de cáncer de mama humano en ratones atímicos, se implantaron 5x10<sup>5</sup> células T47D en ratones atímicos/atímicos NMRI hembra. Los tumores eran subcutáneos, creciendo sobre el lomo del animal. Los tratamientos comenzaban cuando los tumores alcanzaban un volumen medio de 20 mm<sup>3</sup>; ocho días después de la implantación. Antes del primer tratamiento, los ratones se aleatorizaron y se realizaron pruebas estadísticas para asegurar uniformidad en los volúmenes tumorales de partida (media, mediana y desviación estándar) a través de los grupos de tratamiento. El tratamiento empezó con una dosis de carga de 50 mg/kg seguida por inyecciones de 25 mg/kg una vez a la semana mediante inyección intraperitoneal. Una rama de control recibió doxorubicina (calidad farmacéutica). Todos los animales se complementaron con 0,5 mg/kg/semana de estrógeno inyectado i.p.

40 Se dan posteriormente detalles de los grupos de tratamiento.

Gr	N	1° Compuesto	Carga (mg/kg)	Dosis semanal (mg/kg)	Vía	Plan
1.	10	PBS		--	i.p.	una vez/semana
2.	10	doxorubicina		8 mg/kg	i.v.	una vez/semana *
3.	10	U1-53	50 mg/kg	25 mg/kg	i.p.	una vez/semana
			20 ml/kg	10 ml/kg		

\* tratamiento con doxorubicina según se describe por Boveny cols., Cancer Research, 1992.

45 Los datos para el volumen tumoral mediano (Fig. 13) demostraban que la administración de un anticuerpo anti-HER-3 daba como resultado una reducción de crecimiento del tumor.

Ejemplo 20: Los anticuerpos anti-HER-3 humanos inhiben el crecimiento de tumor pancreático humano en ratones SCID

Para probar el potencial terapéutico de anticuerpos anti-HER3 en otros tipos de tumores sólidos, los anticuerpos anti-HER-3, U1-53 y U1-59, se probaron en ratones con tumores establecidos derivados de la línea celular de tumor pancreático humano BxPC3. Como controles, se incluyeron grupos de ratones tratados bien con el control de vehículo, PBS, o bien con el anticuerpo terapéutico establecido, Erbitux.  $5 \times 10^6$  células BxPC3 se inocularon subcutáneamente sin Matrigel en ratones CB17 SCiD. Los ratones que tenían tumores establecidos con un volumen medio de  $140 \text{ mm}^2$  recibieron 50 mg/kg de U1-53, U1-59, Erbitux o el volumen equivalente de PBS a través de inyección intraperitoneal. Posteriormente, los ratones recibieron inyecciones de 25 mg/kg una vez por semana a lo largo de la duración del estudio.

Los resultados para este experimento se muestran en la Fig. 14. U1-53 y U1-59 reducían el crecimiento de tumores pancreáticos humanos de un modo citostático. Notablemente, en este experimento, U1-53 y U1-59 eran más eficaces que el anticuerpo que dirige a EGFR Erbitux para retrasar el crecimiento del tumor. Estos datos demostraban la eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-HER-3 en comparación con el agente terapéutico de referencia.

Ejemplo 21: Combinar los anticuerpos anti-HER-3 humanos con anticuerpos anti-EGFR incrementa la actividad anti-tumoral

La monoterapia de las enfermedades hiperproliferativas con anticuerpos dirigidos está dificultada a menudo por problemas tales como, por una parte, el desarrollo de resistencia a fármacos, y, por otra parte, un cambio en la antigenicidad. Por ejemplo, la pérdida de antigenicidad después del tratamiento prolongado puede hacer a las células tumorales insensibles a anticuerpos terapéuticos, puesto que las células tumorales que no expresan o han perdido el antígeno buscado tienen una ventaja de crecimiento selectivo. Estos problemas se podrían evitar al usar los anticuerpos de la invención en combinación con un anticuerpo terapéutico que se dirige a un receptor diferente sobre células tumorales, u otro agente antineoplástico. Intervenir en múltiples rutas de señalización o incluso rutas relacionadas pero en múltiples etapas de intervención también podría proporcionar beneficio terapéutico. Es probable que estas modalidades de tratamiento combinado sean más eficaces debido a que combinan dos agentes anticancerosos, cada uno trabajando a través de un mecanismo de acción diferente.

A fin de demostrar la viabilidad de los anticuerpos anti-HER-3, U1-53 y U1-59, como agentes de combinación adecuados, se compararon las administraciones monoterapéuticas de U1-53 o U1-59 con aquellas en las que bien U1-53 o bien U1-59 se combinaban con en anticuerpo específico anti-EGFR, Erbitux. Se inocularon subcutáneamente  $5 \times 10^6$  células BxPC3 con Matrigel en ratones CB17 SCiD. Después de que los volúmenes tumorales hubieran alcanzado  $200 \text{ mm}^3$ , los ratones se aleatorizaron en grupos de tratamiento individuales. Se realizaron administraciones intraperitoneales semanales de U1-53, U1-59 y Erbitux como agentes simples o combinaciones de bien de anticuerpos anti-HER3 con Erbitux o bien como un cóctel de dos anticuerpos anti HER-3. Todos los anticuerpos se dosificaron a una sola dosis de carga de 50 mg/kg/semana, seguido por inyecciones semanales de 25 mg/kg durante seis semanas. Las ramas de control recibieron administraciones bisemanales de gemcitabina (120 mg/kg), inyecciones semanales de IgG humana reunida o inyecciones semanales de vehículo (PBS). Los regímenes se detallan posteriormente.

Gr.	N	Compuesto	Dosis de carga (mg/kg)	Dosis semanal (mg/kg)	Vía	Plan
4.	12	PBS	20 ml/kg	10 ml/kg	cada 7 días	i.p.
5.	12	IgG humana reunida	50 mg/kg	25 mg/kg	cada 7 días	i.p.
6.	12	U1-53	50 mg/kg	25 mg/kg	cada 7 días	i.p.
7.	12	U1-59	50 mg/kg	25 mg/kg	cada 7 días	i.p.
8.	12	Erbitux	50mg/kg	25 mg/kg	cada 7 días	i.p.
9.	12	U1-53 + Erbitux	25 mg/kg de cada uno	12,5 mg/kg de cada uno	cada 7 días	i.p.
10.	12	U1-59 + Erbitux	25 mg/kg de cada uno	12,5 mg/kg de cada uno	cada 7 días	i.p.
11.	12	U1-53 + U1-59	25 mg/kg de cada uno	12,5 mg/kg de cada uno	cada 7 días	i.p.
12.	12	Gemcitabina	ninguna	120 mg/kg	2x por semana	i.p.

Los resultados para este experimento se muestran en la Fig. 15. Los anticuerpos U1-53 y U1-59, cuando se administraban como agentes individuales, retrasaban el crecimiento de los tumores pancreáticos humanos en el mismo grado que la gemcitabina, que se usa a menudo como una quimioterapia estándar contra el cáncer pancreático. La coadministración de Erbitux con U1-53 o U1-59 daba como resultado una reducción significativamente mayor del crecimiento tumoral que la observada con la administración de cualquier agente individual de U1-53, U1-59 o Erbitux. Así, se puede alcanzar una respuesta terapéutica beneficiosa al combinar los anticuerpos anti-HER-3 con anticuerpos adecuados que se dirigen a antígenos tumorales separados.

En resumen, los anticuerpos anti-HER-3 de la invención tienen una potente eficacia terapéutica contra tumores humanos in vivo. Se pueden combinar eficazmente con otras terapias antineoplásticas para el incremento de la actividad antitumoral.

5 Ejemplo 22: Los anticuerpos anti-HER-3 humanos inhiben el crecimiento tumoral de melanoma humano en ratones nu/nu

Miembros de la familia erbB de receptores, incluyendo Her3, se expresan anormalmente en una gran variedad de cánceres epiteliales y se sabe que representan un papel importante en el crecimiento y la supervivencia de muchos de estos tumores sólidos. Estos tumores incluyen melanomas, cánceres de células escamosas de cabeza y cuello, cánceres pulmonares no microcíticos y cánceres de próstata, glioma, gástrico, de mama, colorrectal, pancreático, 10 ovárico. A fin de verificar que los anticuerpos anti-Her3 de la invención no están restringidos en su actividad anticancerosa a tipos de tumores individuales, p. ej. cánceres pancreáticos (véase el Ejemplo 21), pero se pueden usar como agentes terapéuticos contra muchos tumores dependientes de HER-3, se probaron U1-53 (anticuerpo comparativo) y U1-59 en estudios de xenoinjerto adicionales. Un ejemplo se muestra en la Fig. 16. Se inyectaron subcutáneamente  $5 \times 10^5$  células de melanoma humano, HT144, en ratones CB17 SCID, seguido por inyección 15 intraperitoneal posterior inmediata de 50 mg/kg de U1-53 y U1-59, el volumen equivalente de PBS o dacarbacina (DITC) en 200 mg/kg. Posteriormente, los ratones recibieron 25 mg/kg de U1-53 o U1-59 una vez por semana, mientras que se daba DITC una vez cada dos semanas en 200 mg/kg.

Los volúmenes tumorales medianos de cada grupo de tratamiento se muestran en la Figura 16. La administración de los anticuerpos daba como resultado una reducción del crecimiento de los melanomas humanos cuando se 20 comparaba con tumores que se habían tratado con el control de vehículo. Estos resultados demuestran que los anticuerpos no están restringidos en su potencial terapéutico y se dirigen a una amplia variedad de cánceres que expresan HER-3.

Ejemplo 23: Los anticuerpos anti-HER-3 humanos inhiben el crecimiento de xenoinjertos de carcinoma de colon en ratones

25 Se suspendieron células de carcinoma de colon humano HT-29 en medio con una relación 2:1 de Matrigel hasta una concentración final de  $10 \times 10^6$  células  $\mu$ /ml. Se inyectaron s. c. 0,2 ml de suspensión celular en el costado derecho de ratones CD1 nu/nu de 4-5 semanas de edad. Se usó un total de 95 ratones.

Los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos de control y tratamiento. El tratamiento empezó el mismo día. La duración del tratamiento era 29 días. Al terminar el estudio, se recogieron tres tumores por grupo 3 horas 30 después de la administración del tratamiento. Los tumores se congelaron rápidamente y se mantuvieron  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Se llevó a cabo el siguiente protocolo de tratamiento:

Grupo de control: IgG humana no específica, 25 mg/kg, dos veces por semana, intraperitoneal

Grupo de tratamiento: anticuerpo U1-53, 25 mg/kg, dos veces por semana, intraperitoneal

35 Grupo de tratamiento: anticuerpo U1-7, 25 mg/kg, dos veces por semana, intraperitoneal

Grupo de tratamiento: anticuerpo U1-59, 25 mg/kg, dos veces por semana, intraperitoneal

Grupo de tratamiento 5-FU: 5-fluorouracilo, 50 mg/kg, 9d x 5, intraperitoneal

Los volúmenes tumorales medianos de cada grupo se muestran en la Fig. 17. La administración de los anticuerpos daba como resultado una reducción del crecimiento de los tumores de carcinoma de colon HT-29 cuando se 40 comparaba con tumores que se habían tratado con IgG1 humana no específica.

Ejemplo 24: Los anticuerpos anti-HER-3 humanos inhiben el crecimiento de cáncer de pulmón en ratones

Células de cáncer de pulmón no microcítico humano Calu-3 se suspendieron en medio con una relación 1:1 de Matrigel hasta una concentración final de  $5 \times 10^1$  células/ml. Se inyectaron s. c. 0,05 ml de suspensión celular en el costado derechos de ratones CB17 scid hembra de 9 semanas de edad. Se usó un total de 60 ratones. 45

Los ratones se seleccionaron aleatoriamente a grupo de control y tratamiento. El tratamiento empezó el mismo día. La duración del tratamiento era 32 días.

Se llevó a cabo el siguiente protocolo de tratamiento:

Grupo de vehículo de PBS

Grupo de control de hG: IgG humana no específica: 25 mg/kg, dos veces por semana, intraperitoneal

5 Grupo de tratamiento anticuerpo U1-53, 25 mg/kg, dos veces por semana, intraperitoneal

Grupo de tratamiento anticuerpo U1-7, 25 mg/kg, dos veces por semana, intraperitoneal

Grupo de tratamiento anticuerpo U1-59, 25 mg/kg, dos veces por semana, intraperitoneal

10 Los volúmenes tumorales medianos de cada grupo de control y tratamiento se muestran en la Fig. 18. La administración de los anticuerpos daba como resultado una reducción del crecimiento de los xenoinjertos de cáncer de pulmón no microcítico humano cuando se comparaba con tumores que se habían tratado con el control de vehículo de PBS o IgG1 humana no específica.

Ejemplo 25: Los anticuerpos anti-HER-3 humanos inhiben el crecimiento de tumor pancreático humano en ratones Balb/C

15 Se suspendieron células de tumor BxPC3 pancreático en medio con una relación 2:1 de Matrigel hasta una concentración final de  $5 \times 10^6$  células por ml. Se inyectaron s. c. 0,2 ml de suspensión celular en el costado derecho de ratones BalbC nu/nu hembra de 5-7 semanas de edad. Se usó un total de 100 ratones.

20 Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de control y tratamiento. El tratamiento empezó el mismo día. La duración del tratamiento era 27 días.

Se llevó a cabo el siguiente protocolo de tratamiento:

Grupo de control de hlgG: IgG2 humana no específica, 25 mg/kg, dos veces por semana, intraperitoneal

Grupo de tratamiento anticuerpo U1-53, 25 mg/kg, dos veces por semana, intraperitoneal

25 Grupo de tratamiento anticuerpo U1-7, 25 mg/kg, dos veces por semana, intraperitoneal

Grupo de tratamiento anticuerpo U1-59, 25 mg/kg, semanalmente, intraperitoneal

Grupo de tratamiento con Gemzar, gemcitabina, 80 mg/kg, semanalmente, intraperitoneal

30 Los volúmenes tumorales medianos de cada grupo de control y tratamiento se muestran en la Fig. 19. La administración de los anticuerpos daba como resultado una reducción del crecimiento de los tumores pancreáticos humanos cuando se comparaba con tumores que se habían tratado con IgG humana no específica o con Gemzar.

35 La inhibición de HER-3 en los tumores pancreáticos humanos también se podría mostrar en un experimento farmacodinámico. Los xenoinjertos de tumores BxPC3 se hicieron crecer como se describe anteriormente. 3 ratones se trataron con 500 µg de un anticuerpo de control de IgG1 y 3 ratones se trataron con 500 µg del anticuerpo anti-HER-3 U1-59. Los ratones se trataron el día 1 y el día 4 y a continuación se sacrificaron el día 5 para medir la inhibición dependiente de anticuerpo de la fosforilación de HER-3 (pHER-3).

40 Los tumores se homogeneizaron en un tampón de RIPA estándar con inhibidores de proteasa. Se separaron 50 µg de lisado transparente en un gel de Tris-glicina al 4-20%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se bloquearon en albúmina de suero bovino (BSA) al 3%. Se realizó inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-pHER-3 (anticuerpo 21D3, Cell Signaling technology). Se usó como un control un anticuerpo anti-actina (AB a-2066, Sigma).

45 La expresión se detectó mediante una quimioluminiscencia aumentada (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las imágenes se capturaron con el Versadoc 5000 Imaging System (BioRad, Hercules, CA).

Los resultados se muestran en la Fig. 20. Después de la administración del anticuerpo anti-HER-3 humano U1-59, ya no era detectable la fosforilación de HER-3. Así, los anticuerpos de la invención son capaces de reducir significativamente la activación de HER-3 en células de tumor pancreático humano.

Ejemplo 26: Uso de anticuerpos anti-HER-3 como un agente de diagnóstico

5 Se puede usar mAn anti-HER-3 en el diagnóstico de enfermedades malignas. HER-3 se expresa sobre células tumorales de un modo muy distinto en comparación con tejido normal y, por lo tanto, un análisis de la expresión de HER-3 ayudaría en el diagnóstico primario de tumores sólidos, la estadificación y la graduación de tumores sólidos, la determinación de criterios de pronóstico para enfermedades proliferativas y neoplasias y el manejo del riesgo en pacientes con tumores positivos a HER-3.

10 A. Detección de antígeno HER-3 en una muestra

Se desarrolla un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) para la detección de antígeno HER-3 en una muestra. En el ensayo, los pocillos de una placa de microvaloración, tal como una placa de microvaloración de 96 pocillos o una placa de microvaloración de 384 pocillos, se adsorben durante varias h con un primer anticuerpo monoclonal completamente humano dirigido contra el antígeno HER-3. El anticuerpo inmovilizado sirve como un anticuerpo de captura para cualquier antígeno HER-3 que pueda estar presente en una muestra de prueba. Los pocillos se enjuagan y se tratan con un agente de bloqueo tal como proteína de la leche o albúmina para evitar la adsorción no específica del analito.

Posteriormente, los pocillos se tratan con una muestra de prueba que se sospecha que contiene el antígeno HER-3, o con una solución que contiene una cantidad estándar del antígeno HER-3. Tal muestra es, por ejemplo, una muestra de suero procedente de un sujeto que se sospecha que tiene niveles de antígeno HER-3 circulatorios considerados un diagnóstico de una patología. Después de enjuagar la muestra de prueba o el estándar, los pocillos se tratan con un segundo anticuerpo monoclonal completamente humano anti-HER-3 que se etiqueta mediante conjugación con biotina. El anticuerpo anti-HER-3 etiquetado sirve como un anticuerpo de detección. Después de enjuagar el exceso de anticuerpo secundario, los pocillos se tratan con peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada a avidina y un sustrato cromogénico adecuado. La concentración del antígeno HER-3 en las muestras de prueba se determina mediante comparación con una curva estándar desarrollada a partir de las muestras estándar.

B. Detección de antígeno HER3 en inmunohistoquímica (IHC)

A fin de determinar el antígeno HER3 en secciones de tejido mediante IHC, tejidos embebidos en parafina se desparafinan en primer lugar en xileno durante 2 x 5 min y a continuación se hidratan con etanol al 100% 2 x 3 min, etanol al 95% 1 min y se enjuagan en agua destilada. Epítomos antigénicos enmascarados mediante fijación con formalina e imbibición en parafina se exponen mediante desenmascaramiento epitópico, digestión enzimática o saponina. Para el desenmascaramiento epitópico, secciones de parafina se calientan en un vaporizador, un baño de agua o un horno de microondas durante 20-40 min en una solución de recuperación epitópica como por ejemplo solución de HCl 2 N (pH 1.0). En el caso de la digestión enzimática, secciones de tejido se incuban a 37°C durante 10-30 minutos en diferentes soluciones enzimáticas tales como proteinasa K, tripsina, pronasa, pepsina, etc.

Después de enjuagar la solución de recuperación epitópica o la enzima en exceso, las secciones tisulares se tratan con un tampón de bloqueo para prevenir interacciones inespecíficas. El anticuerpo primario se incuba con diluciones apropiadas en tampón de dilución durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche. El anticuerpo primario en exceso se enjuaga las secciones se incuban en solución de bloqueo de peroxidasa durante 10 min a temperatura ambiente. Después de otra etapa de lavado, las secciones tisulares se incuban con un segundo anticuerpo secundario etiquetado con un grupo que podría servir como un anclaje para una enzima. Ejemplos de los mismos son anticuerpos secundarios etiquetados con biotina que son reconocidos por peroxidasa de rábano picante acoplada a estreptavidina. La detección de dicho complejo de anticuerpo/enzima se consigue al incubarse con un sustrato cromogénico adecuado.

C. Determinación de la concentración de antígeno HER-3 en suero de pacientes

Se desarrolla un ELISA tipo sándwich para cuantificar los niveles de HER-3 en suero humano. Los dos anticuerpos monoclonales humanos anti-HER-3 usados en el ELISA tipo sándwich reconocían diferentes dominios en la molécula de HER-3 y no compiten por la unión, por ejemplo, véase el Ejemplo 8. El ELISA se realiza como sigue: 50 µl de anticuerpo de captura anti-HER-3 en tampón de revestimiento (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 9,6) en una concentración de 2 µg/ml se revistieron sobre placas de ELISA (Fisher). Después de la incubación a 4°C durante la noche, las placas se tratan con 200 µl de tampón de bloqueo (BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,1%, timerosal al 0,01% en PBS) durante 1 h a 25°C. Las placas se lavaron (3x) usando Tween 20 al 0,05% en PBS (tampón de lavado, WB). Sueros normales o de paciente (Clinomics, Bioreclamation) se diluyen en tampón de bloqueo que contiene 50% de suero humano. Las placas se incuban con muestras de suero durante la noche a 4°C, se lavaron con WB y a continuación

5 se incubaron con 100 µl/pocillo de anticuerpo de detección anti-HER-3 biotinilado durante 1 h a 25°C. Después del lavado, las placas se incuban con HRP-estreptavidina durante 15 min, se lavaron como anteriormente y a continuación se trataron con 100 µl/pocillo de o-fenilendiamina en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (solución de revelado de Sigma) para la generación de color. La reacción se detiene con 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 M) y se analizaron usando un lector de placas de ELISA a 492 nm. La concentración de antígeno HER-3 en muestras de suero se calcula mediante comparación con diluciones de antígeno HER-3 purificado usando un programa de ajuste de curvas de cuatro parámetros.

#### Estadificación del cáncer en un paciente

10 Basándose en los resultados indicados y analizados bajo los puntos A., B. y C, a través del uso de la presente invención, es posible estadificar un cáncer en un sujeto basándose en los niveles de expresión del antígeno HER-3. Para un tipo de cáncer dado, se toman muestras de sangre de sujetos diagnosticados de diversos estadios en el avance de la enfermedad, y/o en diversos puntos en el tratamiento terapéutico del cáncer. La concentración del antígeno HER-3 presente en las muestras de sangre se determina usando un método que determina específicamente la cantidad del antígeno que está presente. Tal método incluye un método de ELISA, tal como el método descrito bajo los puntos A. y B. Usando una población de muestras que proporciona resultados estadísticamente significativos para cada estadio de avance o terapia, se señala una gama de concentraciones del antígeno HER-3 que se puede considerar característica de cada estadio.

20 A fin de estadificar el avance del cáncer en un sujeto bajo estudio, o de caracterizar la respuestas del sujeto a un ciclo de terapia, se toma una muestra de sangre del sujeto y se determina la concentración del antígeno HER-3 presente en la muestra. La concentración así obtenida se usa para identificar en qué intervalo de concentraciones está el valor. El intervalo así identificado se correlaciona con un estadio de avance o un estadio de terapia identificado en las diversas poblaciones de sujetos diagnosticados, proporcionando de ese modo un estadio en el sujeto bajo estudio.

25 Ejemplo 27: Usos de anticuerpos y conjugados de anticuerpo anti-HER-3 para el tratamiento o la prevención de enfermedades hiperproliferativas

30 Muchos tumores sólidos son conducidos por señalización mediada por la familia HER y se ha demostrado que HER-3 es un socio crucial a través de la formación de complejos entre HER-1, HER-2 y HER-4. Por lo tanto, una reducción o eliminación de la señalización mediada por HER-3 afectaría a todos los otros miembros de la familia HER y dificultaría la señalización celular conduciendo a una amplia gama de intervenciones terapéuticas y potencial en terapia combinada con otros agentes, materiales biológicos y agentes citotóxicos dirigidos. Así, los anticuerpos anti-HER-3 de la invención se pueden usar para el tratamiento de ciertos trastornos hiperproliferativos o asociados con HER-3, que se basan en un número de factores como, por ejemplo, la expresión de HER-3. Tipos de tumores como cáncer de mama, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de estómago, cáncer endometrial, cáncer de las glándulas salivares, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga urinaria, glioma, melanoma, otros cánceres que expresan o sobreexpresan HER-3 parecen presentar indicaciones preferidas, pero las indicaciones no se limitan a las de la lista precedente. Además, los siguientes grupos de pacientes se beneficiarán del tratamiento con mAb dirigidos anti-HER-3:

40 Pacientes con resistencia al tratamiento con mAb anti-HER-2

Pacientes no elegibles para el tratamiento con mAb anti-HER-2

Pacientes con resistencia a mAb anti-HER-1 o un inhibidor anti-EGFR de molécula pequeña

Pacientes con cáncer de pulmón no microcítico resistente a erlotinib o gefitinib.

45 Los anticuerpos anti-HER-3 de la invención se usaron bien como una monoterapia o en combinación con uno o más agentes en una llamada "terapia combinada". Dicha terapia combinada puede incluir, pero no se limita a, agentes que se especificaron previamente en la invención. La terapia combinada con anticuerpos anti-HER3 y otros agentes puede prolongar la supervivencia del paciente, el tiempo hasta el avance del tumor o la calidad de vida del paciente. El protocolo y el diseño de administración se dirigirán a la eficacia terapéutica así como a la capacidad para reducir las dosis habituales de las terapias estándar, como por ejemplo quimio- o radioterapia.

50 Tratamiento de seres humanos con anticuerpos anti-HER-3 de la invención

Para determinar los efectos in vivo del tratamiento con anticuerpos anti-HER-3 en pacientes humanos con tumores, tales pacientes son inyectados a lo largo de una cierta cantidad de tiempo con una cantidad eficaz de anticuerpo anti-HER-3 de la invención. En momentos periódicos durante el tratamiento, los pacientes humanos son controlados para determinar sus avances de los tumores, en particular si los tumores crecen y se metastatizan.

5 Un paciente con tumor tratado con los anticuerpos anti-HER-3 de la invención tiene un nivel inferior de crecimiento y/o metástasis tumorales en comparación con el nivel de crecimiento y metástasis tumorales en pacientes con tumores tratados con el patrón actual de cuidado terapéutico.

Tratamiento con conjugados de anticuerpo anti-HER-3 de la invención

10 Para determinar los efectos in vivo de conjugados de anticuerpo anti-HER-3 de la invención, pacientes humanos o animales fueron inyectados a lo largo de una cierta cantidad de tiempo con una cantidad eficaz de conjugado de anticuerpo anti-HER-3 de la invención. Por ejemplo, el conjugado de anticuerpo anti-HER-3 administrado es conjugado de DM1-anticuerpo anti-HER-3, un conjugado de auristatina-anticuerpo anti-HER-3 o conjugado de radioisótopo-anticuerpo anti-HER-3. En momentos periódicos durante el tratamiento, los pacientes humanos o los animales se controlan para determinar si sus tumores avanzan, en particular si los tumores crecen y se metastatizan.

20 Un paciente humano o una animal que exhibe tumores y está sometido a tratamiento con, por ejemplo, conjugados de DM1-anticuerpo anti-HER-3 o radioisótopo-anticuerpo anti-HER-3 tiene un nivel inferior de crecimiento y metástasis tumorales cuando se compara con un paciente o animal de control que exhibe tumores y está sometido a tratamiento con una terapia alternativa. DM1-anticuerpos de control que se pueden usar en animales incluyen conjugados que comprenden DM1 conectado a anticuerpos del mismo isotipo de los anticuerpos anti-HER-3 de la invención, pero más específicamente, no teniendo la capacidad para unirse al antígeno tumoral HER-3. Radioisótopo-anticuerpos de control que se pueden usar en pruebas en animales incluyen conjugados que comprenden radioisótopo conectado a anticuerpos del mismo isotipo de los anticuerpos anti-HER-3 de la invención, pero más específicamente, no teniendo la capacidad para unirse a antígeno tumoral HER-3. Nota: los conjugados de control no se administrarían a seres humanos.

### Anotaciones generales

30 Se considera que la memoria descriptiva escrita anteriormente es suficiente para permitir que un experto en la especialidad ponga en práctica la invención. La presente invención no se debe limitar en alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada se entiende como una ilustración individual de ciertos objetos de la invención. El depósito de material de la presente no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en la presente sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier objeto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni se debe considerar que limite el alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa.

40 La descripción y los Ejemplos precedentes detallan ciertas realizaciones preferidas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Sin embargo, se apreciará que independientemente de cuán detallada pueda aparecer lo precedente en el texto, la invención se puede poner en práctica de muchas maneras y la invención se debe considerar según las reivindicaciones adjuntas de la misma.

45 Por otra parte, a menos que se defina otra cosa, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tienen los significados que se entienden comúnmente por los expertos normales en la especialidad. Además, a menos que sea requerida otra cosa por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, el cultivo celular y tisular, la biología molecular y la química y la hibridación de oligo- y polinucleótidos descritas en la presente son las bien conocidas y comúnmente usadas en la especialidad. Se usan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación tisulares (p. ej. electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan según las especificaciones de los fabricantes o como se efectúan comúnmente en la especialidad o como se describen en la presente. Las técnicas y los procedimientos precedentes se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la especialidad y según se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, p. ej. Sambrook y cols. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)).

55 Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y las técnicas de laboratorio de, la química analítica, la química orgánica sintética y la química médica y farmacéutica descritas en la presente son las bien conocidas y comúnmente usadas en la especialidad. Se usan técnicas estándar para las síntesis químicas, los análisis químicos, la preparación farmacéutica, la formulación y el aporte y el tratamiento de los pacientes.

60

**LISTA DE SECUENCIAS**

Anticuerpo U1-39

1 ADN de la Cadena Pesada:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGGTTCACCGTCAGTAGCAACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGATTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGGTGGTAGCACATACTACGCA  
GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTT  
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGCAGTGG  
CTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

5 2 Proteína de la Cadena Pesada:

EVQLVESGGGLIQPGLSRLSLSAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLDWVSVIYSGGSTYYA  
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGQWLDVWGQGT'TVTVSS

3 ADN de la Cadena Ligera:

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC  
ATCTCCTGCAGGTCAAGTCAGAGCCTCCTGTATAGTAATGGATACAACATTTGGATTGG  
TACCTGCAGAGGCCAGGGCAGTCTCCACAACCTCCTGTTCTATTTGGGT'TTTCATCGGGCC  
TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC  
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCAGGCAAGCTCTACAAACTCCG  
CTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA

4 Proteína de la Cadena Ligera:

10 DIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQRPQSPQLLFYLGPHRA  
SGVPDFRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYCRQALQTPPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-40

5 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGTACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTCAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT  
AGGGAACCTGGAACCTTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAG  
GTCACCGTCTCCTC

6 Proteína de la Cadena Pesada:

15 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYSSGSTY  
YNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDRELELYYYYYGMDVWGQGT  
TVTS

7 ADN de la Cadena Ligera:

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC  
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTATAGTAATGGATACAACATTTGGATTGG  
TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGT'TCTAATCGGGCC  
TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC  
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGATTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCG  
CTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA

8 Proteína de la Cadena Ligera:

DIVMTQSPPLSLPVTPEPAPISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGIYYCMQALQTPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-38

9 ADN de la Cadena Pesada:

5 CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTG  
ACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTGGAGTGGGTGTGGGCTGGATCCGT  
CAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGGACTGGCTTGCACCTCATTTATTGGAATGATGATAAGCGC

TACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTG  
GTCCTTACAATGACCAACATGGATCTTGTGGACACAGCCACATATTAATGCTGTACACAGA  
GACGAAGTTCGAGGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

10 Proteína de la Cadena Pesada:

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALDWLALIYWDDKR  
YSPSLKSRLLTIKDTSKNQVVLMTNMDLVDATYYCVHRDEVRFDYWGQGLVTVSS

10 11 ADN de la Cadena Ligera:

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCCTCC  
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATACAGTGGATACACCTACTTGCATTTGG  
TTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTTATTTATAAGGTTTCTAACTGGGAC  
TCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTGAGGCACCTGATTTACACTGAAAATC  
AGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGCATGCAAGGTGCACACTGGCCG  
ATCACCTTCGGCCAAGGGACACCGACTGGAGATTAAA

12 Proteína de la Cadena Ligera:

DVVMTQSPPLSLPVTLQOPASISCRSSQSLVYSDGYTYLHWFQQRPGQSPRRLIYKVSINWD  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCMQGAHWPIITFGQTRLEIK

Anticuerpo U1-41

15 13 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACCTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCCGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGAT  
CGGGAACCTTGAGGTTACTCCAACCTACTACGGTGTGGACGTCTGGGGCAAGGGACCACG  
GTCACCGTCTCCTC

14 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGSTY  
YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYFCARDRELEGYSNYYGVDVWGQGT  
VTVS

20 15 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGCCATTAGCAACTATTTAAATGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGAATAATAGTCTCCCGATCACCTTCGGCCAA  
GGGACACGACTGGAGATTAAA

16 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQAIISNYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNNSLPITFGQGRLEIK

Anticuerpo U1-42

5 17 ADN de la Cadena Pesada:

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC  
TCCTGTAAGGGTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATG  
CCCCGGAAAGGCCCTGGAGTGGATGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATA  
AGCCCCGTCCCTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCCTAC  
CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCCTCGGACACCGCCATGTATTAAGTGTGCGAGACATGAA  
AACTACGGTGACTACAACACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

18 Proteína de la Cadena Pesada:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS TRY  
SPSFQGVVITISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARHENYGDYNYWGQGLVTVSS

19 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGCGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTCGCAGCTATTTAAATGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCTTCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT  
GAAGATTTTGCACTTTACTGCTGTCAACAGAGTAACGGTTCCTCCGCTCACTTTTCGGCGGA  
GGGACCAAGGTGGAGATCAA

10

20 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI RSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFALYCCQQSNGSPLTFGGGTRKVEIK

Anticuerpo U1-43

21 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTACCATATCAGTAGACACGTCFAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGTATTAAGTGTGCGAGAGAT  
AGAGAGAGAGAGTGGGATGATTACGGTGACCCCAAGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG  
ACCACGGTCACCGTCTCCTC

15

22 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYSGSTY  
YNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDREWEREDDYGDPOGMDVWGQG  
TPTVTVS

23 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTTAGCAGCTATTTACATTTGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCATGCTGCATCCAGTTTACAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGTCTGCAACCT  
GAAGATTTTGCACCTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTAACCCGCTCACTTTCGGCGGA  
GGGACCAAGGTGGAGATCCAA

24 Proteina de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQSISSYLHWYQQKPKAPKLLIHAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSYSNPLTFGGGTKVEIQ

5 Anticuerpo U1-44

25 ADN de la Cadena Pesada:

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAGATC  
TCCTGTAAGGGTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATG  
CCCGGAAAGCCCTGGAGTGGATGGGATCATCTGGCCTGGTGACTCTGATACCATATAC  
AGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTCAACATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCCTAC  
CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCCTCGGACACCCGCATGTATTAATCTGTGCGAGACATGAA  
AACTACGGTGACTACAACACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA

26 Proteina de la Cadena Pesada:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIWPGDSDTIY  
SPSFQGVITISADKSIISTAYLQWSSLRASDTAMYYCARHENYGDYNYWGQGLVTVSS

10 27 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTCGAAGTTATTTAAATTTGGTATCAGCAGAAACCG  
GGGAATGCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT  
GAAGATTTTGCACCTTACTACTGTCAACAGAGTATCAGTTCCTCCGCTCACTTTCGGCGGA  
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

28 Proteina de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGNAPKLLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFALYYCQSSISPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo (U1-45)

15 29 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC  
TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAGTTATGATATCAACTGGGTGCGACAGGCC  
ACTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATGAACCCTAACAGTGGTGACACTGGCTAT  
GCACAGGTGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCTGGAACACCTCCATAAGCACAGCCCTAC  
ATGGAACCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTAATCTGTGCGAGATTTGGG  
GATCTCCCGTATGACTACAGTTACTACGAATGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTG  
GTCACCGTCTCCTC

30 Proteina de la Cadena Pesada:

# ES 2 621 546 T3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFPSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGDTGY  
AQVFQGRVTMTWNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFGDLFDYDYSYEWFDWPWGQGL  
VTVS

31 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGCCAGAGCAATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCA  
GGGAAAGCCCCAAGCTCCTGATCTATGCAGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT  
GAAGATTTTGCACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACTTTGCGCGGA  
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

32 Proteína de la Cadena Ligera:

5 DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSISSYLNWYQQRPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo (U1-46)

33 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTC  
ACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTCTGCTTGGAACTGGATCAGG  
CAGTCCCCATCGAGAGGCCCTTGAAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTAT  
AATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAAC  
CAGTTCTCCCTGCAGCTGAACCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCA  
AGAGATCTCTACGATTTTGGAGTGGTTATCCCTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGC  
CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTC

34 Proteína de la Cadena Pesada:

10 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWKY  
NDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDLYDFWWSGYPYYGMDVWG  
QGTTVTVS

Anticuerpo U1-47

35 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTC  
ACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTCTGCTTGGAACTGGATCAGG  
CAGTCCCCATCGAGAGGCCCTTGAAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTAT  
AATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAAC  
CAGTTCTCCCTGCAGCTGAACCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCA  
AGAGATTACTATGGTTCGGGGAGTTTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAA  
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTC

36 Proteína de la Cadena Pesada:

15 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWKY  
NDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDYYGSGSFYYYYGMDVWQG  
GTTVTVS

37 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCTAAGGTCTGATCTATGCTGCATCCAATTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTPCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT  
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCGGACGTTTCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

38 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSISSSYLNWYQQKPKAPKVLIIYAAENLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-48

5 39 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTFACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCC  
GCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCATATCTATAACAGTGGGAGCACCAACTACAAC  
CCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG  
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGCGATT  
TTTGGAGTGGGCCCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTC  
ACCGTCTCCTC

40 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKLEWIGHIYTSGSTNYN  
PSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREAI FGVGPYYYYGMDVWGQGTTV  
TVS

Anticuerpo U1-49

10 41 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC  
TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCC  
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGATGGATCAACCCTAATAATGGTGGCACAAACTGT  
GCACAGAAGTTTCAGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC  
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGA  
CGGTATAGCAGCAGCTGGTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC  
ACGGTCACCGTCTCCTC

42 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFYGYMHWRQAPGQGLEWMGWINPNIIGGTNC  
AQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGGRYS SWSYYYYGMDVWGQGT  
TVTVS

43 ADN de la Cadena Ligera:

GATATTCTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTACCCCTGGACAGCCGGCCTCC  
ATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCTTAGTGATGGAGGGACCTATTTGTATTGG  
TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCT  
TCTGGAGTGCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATC  
AGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATGCAGCTTCCG  
ATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAAATTA

15

44 Proteína de la Cadena Ligera:

DILMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLLSDGGTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF  
SGVPDRFSGSGSSTDFTLTKISRVEAEDVGVVYCMQSMQLPITFGQGRLEIK

Anticuerpo U1-50

45 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCGTCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGG  
CAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGCACC AAC  
TACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTC CAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGG  
GGGGACAGTAACTACGAGGATTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG  
ACCACGGTCACCGTCTCCTC

5 46 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGGYYSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGSTN  
YNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGDSNYEDY YYYGMDVWGQG  
TITVTVS

47 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCATCTATTTACATTTGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCTAAGCTCTTGATCTCTGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCA  
AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGAAGTCTGCAACCT  
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACACTTCCCCGATCACCTTCGGCCAA  
GGGACACGACTGGAGATTAAA

48 Proteína de la Cadena Ligera:

10 DIQMTQSPSSLSASVGRVTTTCRASQSIYIHLHWYQQKPKAPKLLISAASSLQSGVPS  
RFSFGSGSSTDFTLTIRSLQPEDFATYYCQQSYTSPITFGQGRLEIK

49 Anticuerpo U1-51 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCC  
CCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGCACC AACCTACAAC  
CCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTC CAAGCACCAGTTCCTCCCTG  
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTCGAGT  
TACTATGATAGTAGTGGTTATTACTTATACTACTACGCTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG  
ACCACGGTCACCGTCTCCTC

50 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISYYYSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGSTNYN  
PSLKRVTISVDTSKHQFSLKLSVTAADTAVYYCARDSSYYDSGGYLYYYAMDVWGQG  
TITVTVS

15

51 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC  
ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAATACTACTAGCT  
TGGTACCAGCAGAAAACCAGGACAGCTCCTAAGCTGCTCATTTCTGGGCATCTACCCGG  
GAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACC  
ATCAGCAGCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATACTACT  
CCTCTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA

52 Proteina de la Cadena Ligera:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPELLISWASTR  
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLAEDVAVYYCQQYVYTTPLTFPGTKVDIK

5 Anticuerpo U1-53

53 ADN de la Cadena Pesada:

GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTATCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTAGTAGTACCATATACTAC  
GCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAATCACTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGTATTTACTGTGCGAGAGATAGG  
GGTGACTTCGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA

54 Proteina de la Cadena Pesada:

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYY  
ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGMVTVSS

55 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAACCAACTATTTGAATTGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCA'CCAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCCACATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATATTGCAACATATAACTGTCAACAGTGTGAAAAATTTCCCGATCACCTTCGGCCAA  
GGGACACGACTGGAGATTAAA

56 Proteina de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS  
RFSGSGSGTDFTFTLSSLPEDIATYNCQQCENFPITFGQGRLEIK

15 Anticuerpo U1-55

57 ADN de la Cadena Ligera:

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC  
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTATAGTAATGGATACAAGTATTTGGATTGG  
TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTCTAATCGGGCC  
TCCGGGGTCCC'FGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC  
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTATTGCATGCAGGCTCTACAAACTCCG  
ATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

58 Proteina de la Cadena Ligera:

DIVMTQSPFLSLPVTPEPASTISCRSSQSLLYSNGYKYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYVYCMQALQTPITFGQGRLEIK

Anticuerpo (U1-55.1)

59 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCGTCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAAGTGGATCCGG  
CAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCAATTACAGTGGGAGCACC AAC  
TACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGATTTACTGTGCGAGAGAT  
CGAGAAGTGGAACTTTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACG  
5 GTCACCGTCTCCTC

60 Proteina de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYINYSGSTN  
YNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDRELELYYYYYYGMVWVWGQGT  
VTVS

Anticuerpo (U1-57)

61 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCTGAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCGTCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAAGTGGATCCGG  
CAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCAATTACAGTGGGAGCACC AAC  
TACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGATTTACTGTGCGAGAGAT  
10 CGAGAAGTGGAACTTTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACG  
GTCACCGTCTCCTC

62 Proteina de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYINYSGSTN  
YNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDRELELYYYYYYGMVWVWGQGT  
VTVS

Anticuerpo U1-57.1

15 63 ADN de la Cadena Ligera:

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCAACCCTGGAGAGCCGGCCTCC  
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTATAGTAATGGATACAAGTATTTGGATTGG  
TACCTGCAGAAGCCAGGCAGTCTCCACAGCTCATGATCTATTTGGGTCTAATCGGGCC  
TCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACTGAAAATC  
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTATTGCATGCAGGCTCTACAAACTCCG  
ATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

64 Proteína de la Cadena Ligera:

DIVMTQSPSLPVTPEPASISCRSSQSLLYSNGYKYLDWYLOKPGQSPQLMIYLGSNRA  
SGVPDRFSGSGSSTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGQGRLEIK

Anticuerpo U1-58

65 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTAT  
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTTACTGTGCGAGAGCAGCT  
CGCCTTGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC  
TCA

5

66 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSNKYY  
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARARLDYIYGMVWVWGQGTITVTVS  
S

67 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCTCC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAACAGCTATTTAAATTTGGTTTCAGCAGAAGCCA  
GGGAAAGCCCTCAGCTCCTGATCTTTGGTGCATCCGGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGTCTGCAACCT  
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTTCCCGCTCACCTTCGGCCAA  
GGGACACGACTGGAGATTAAA

10

68 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVCDRVSIITCRASQINSYLNWFQOKPGKAPQLLIFGASGLQSGVPS  
RFSGSGSSTDFTLTINSLQPEDFATYYCQSYSSPLTFGQGRLEIK

Anticuerpo U1-59

69 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCGCTGTCTAAGTGGGTCCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCC  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAAATCAATCATAGTGGAAAGCACAACACTACAAC  
CCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAAACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG  
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTTACTGTGCGAGAGATAAGTGG  
ACCTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA

15

70 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQOWCAGLLKPSSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYN  
PSLKSRVTVISVETSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS

71 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCGAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC  
ATCAACTGCAGGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAGCAATAGGAACTACTTAGCT  
TGGTACCAGCAGAACCCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCTTCTACCCGG

## ES 2 621 546 T3

GAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACC  
ATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACT  
CCTCGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAA

72 Proteína de la Cadena Ligera:

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTR  
ESGLVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYQCQYYSTPRTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-52

5 73 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATGGGGAACATCTATACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTGAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAGGG  
GGAACTGGAACCAATTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCCTGGGGCCAAGGGACCACG  
GTCACCGTCTCCTC

74 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWMGNIYYSGSTY  
YNPSLKSRTVTSVDTSENQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGTGTNYYYYYGMDVWGQGT  
VTVS

75 ADN de la Cadena Ligera:

GAAATTGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACC  
CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA  
CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCTGGGCCACTGGCATCCCA  
AACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG  
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCCGGC  
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

10

76 Proteína de la Cadena Ligera:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSWATGIP  
NRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGS SPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-61

77 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGTCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCAGGATGGGCTGGAGTGGATGGGTACATCTATACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCCACATATCAGAAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTAATTACTGTGCGAGAGAT  
TCCGAGTCCGAGTATAGCAGCTCGTCAACTACGGTATGGACGTCCTGGGGCCAAGGGACC  
ACGGTCACCGTCTCCTC

15

78 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGVSISSGGYYWSWIRQHPGMGLEWIGYIYYSGSTY  
YNPSLKSRTVTSIEDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDSESEYSSSSNYGMDVWGQGT  
VTVS

Anticuerpo U1-61.1

79 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGTCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGATGGGCCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATPACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCTCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGAAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT
TCCGAGTCCGAGTATAGCAGCTCGTCGAACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCCTC

5 80 Proteina de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGVSISSGGYYWSWIRQHPGMGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKRVTISEDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDSESEYSSSSNYGMDVWGQGT
TVTVS

81 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAATCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGACCATTAGCAGCTATTTAAA'TGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCC'TAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGT'TTGCAAGGTGGGGTCCCATCA
AGGTT'CAGTGGCAGTGTATCTGGGACAGAT'TTACCCTCACCGTCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTAACCCGCTCACT'TTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

82 Proteina de la Cadena Ligera:

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRIITTCRASQTISYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQGGVPS
RFSGSVSGTDFLTVSSLPEDFATYYCQQSYSNPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-62 (2.9.1)

83 ADN de la Cadena Pesada:

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAGATC
TCCTGTAAGGGTTCGGATACAGT'TTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATG
CCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTACTCTGATACCAGATAC
AGCCCGTCC'TCCAAGGCCAGGTACCATGTCAGCCGACAAGTCCATCAGTACCGCCTAC
CTGCAGCTGAGCAGCCATGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAGAT
GGCTGGAACACTACGTACATCACGGTGTATCGAGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTC
ACCGTCTCCTC

84 Proteina de la Cadena Pesada:

15 EVQLVQSGAEVKKPGESLKIICKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWMIYIPGDS DTRY
SPSFQGGVMTMSADKSIISTAYLQLSSHEGLGHRHVLLETDCGWLRTSRVIETSWGQGTTV
TVS

85 ADN de la Cadena Ligera:

GAAATTTGTGTTGACCGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTATCAGCATCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
GACAGGTT'CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGCAGTT'TGGC
CAGGGGACCAAACCTGGAGATCAAA

86 Proteina de la Cadena Ligera:

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVISIIYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP  
DRFSGSGSGTDFTLTIISRLEPEDFAVYVYCOQYGSPPCSFGQGTKLEIK

Anticuerpo U1-2

87 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCG  
GATTACGATTTTGGAGTGGTTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCGTGTCACCGTC  
TCCTCA

5

88 Proteina de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSSLTCTVSGGSISSGDYIYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY  
YNPFLSRVITISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTV  
SS

89 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGCAAGTCAGGGCAATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGATACCT  
GGGAAAGCCCCAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCTCACAATCAACAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGAACCTTATTACTGTCTACAGCATAATGGTTACCCGTGGACGTTCCGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

10 90 Proteina de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGIKNDLWYQQIPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSFGSGSGTEFTLTINSLQPEDFATYYCLQHNGYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-7

91 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGATACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCG  
GATTACGATTTTGGAGTGGTTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCGTGTCACCGTC  
TCCTCA

15 92 Proteina de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSSLTCTVSGGSISSGDYIYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY  
YNPFLSRVITISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTV  
SS

93 ADN de la Cadena Ligera:

GACTTCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTCGAAATGATTTAGGCTGGTATCGGCAGAAACCT  
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

94 Proteina de la Cadena Ligera:

DFQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDIRNDLGWYRQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

5 Anticuerpo U1-9

95 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGAATTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTTGGATACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAATAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCG  
GATTACGATTTTGGAAATGGTTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCGTGGTCACCGTC  
TCCTCA

96 Proteina de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGSTY  
YNPFLKSRVTISIDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWNGYFDYWGQGLVTV  
SS

10 97 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTCGAAATGATTTAGGCTGGTATCGGCAGAAACCT  
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

98 Proteina de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDIRNDLGWYRQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

15 Anticuerpo U1-10

99 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGAATTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGACTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCA  
GATTACGATTTTGGAGTGGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCGTGGTCACCGTC  
TCCTCA

# ES 2 621 546 T3

## 100 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPTQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY  
YNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTV  
SS

## 101 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAATTACCCGTGGACGTTCCGCCAA  
GGGACCAAGGTGAAAATCAAA

## 5 102 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIKNDLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNNYPWTFGQGTKVEIK

## Anticuerpo U1-12

## 103 ADN de la Cadena Pesada

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTGGTGAATTAATACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTAATACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAAACAGTTC  
TCCCTGAAGTTCGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGATTAATACTGTGCGAGAGCC  
GATTACGATTTTTCGAGTGGTTATTTTACTACTGGGGCCAGGAAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCA

## 10 104 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY  
YNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTV  
SS

## 105 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAATTACCCGTGGACGTTCCGCCAA  
GGGACCAAGGTGAAAATCAAA

## 106 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIKNDLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
15 RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNNYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1 - 13

107 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGTATFACTGTGCGAGAGAG  
GACGACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

108 Proteína de la Cadena Pesada:

5 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGSTY  
YNPFLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTPAADTAVYYCAREDDGMDVWGQGTITVTVSS

109 ADN de la Cadena Ligera:

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC  
ATTTCCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCATAGTAATGGATACAACCTATTGGAAATGG  
TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCCACAGTTCATGATTTATTTGGGGTCTAATCGGGCC  
TCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC  
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAACTCCG  
ATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

110 Proteína de la Cadena Ligera:

DIVMTQSPFLSLPVTPEGPASISCRSSQSLLSHNGYNYLEWYLQKPGQSPQFMIYLGSRNA  
SGVPDRFSGSGSTFDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGQGRLEIK

10 Anticuerpo U1-14

111 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGTACCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGGTCGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGTATFACTGTGCGAGAGCG  
GATTACGATTTTGGAGTGGTTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCA

112 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQYPGKLEWIGYIYYSGSTY  
YNPFLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTPAADTAVYYCARADYDFWGSYFDYWGQGTITVTV  
SS

15 113 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGC'TGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTPATTTACTGTCTACAGCATAATACTTACCCGTGGACGTTCCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

114 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIRNDLGWYQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYCYLQHNTYPTWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-15

115 ADN de la Cadena Pesada:

5 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCGTCAGCAGTGGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCGG  
CAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGACTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAAC  
TACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGAT  
GGGGACGTGGATACAGCTATGGTCGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAAATGGTC  
ACCGTCTCCTCA

116 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGGYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGSTN  
YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDGDVDTAMVDADFIDWGQTMV  
TVSS

117 ADN de la Cadena Ligera:

10 GAAATTGTATTTGACGCGAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC  
CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTTTAAGCGGCAACTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAG  
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCATCATCTGTGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA  
GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCACAAGACTGGAG  
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGTCAGCAGTATGATAGGTCACCGCTCACTTTCGGC  
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

118 Proteína de la Cadena Ligera:

EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSLSGNYLAWYQKPGQAPRLIICGASSRATGIP  
DRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQYDRSPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-19

119 ADN de la Cadena Pesada:

15 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGAATTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGGA  
GATTACGATTTTGGAGTGGAGAGTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
TCCTCA

120 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLTSLTCTVSGGSISSGDYYSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGSTY  
YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGDYDFWSGEFDYWGQGLVTV  
SS

Anticuerpo U1-20

121 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATGACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT  
CAGGGGCAGGACGGATACAGCTATGGTTACGGCTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGC  
CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTC

122 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYDSGSTY  
YNPSLKS RVTISVDTISKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDQGDGYSYGYGYYYGMDVWG  
QGTTVTVS

5

123 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCAGCGAGTCAGGACATAGCAATTAATTTAAATPGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCTAAACTCCTGATCTACGTTGCATCCAATTFGGAAACAGGGGTCCCATCA  
AGGTTCACTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATATGCAACATATTACTGTCAACAGTGTGATAATCTCCCTCTCACTTTCGGCGGA  
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

124 Proteína de la Cadena Ligera:

124 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCQASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIYVASNLETGVPS  
RFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQQCDNLP LTFGGGT KVEIK

10

Anticuerpo U1-21

125 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGATACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCG  
GATTACGATTTTGGAGTGGTTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCTGSTCACCGTC  
TCCTC

126 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGSTY  
YNPSLKS RVTISVDTISKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTV  
S

15

127 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCGGCAGAAACCT  
GGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

128 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNDLGWYRQKPGKAPKRLIYAASRLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

5 Anticuerpo U1-22

129 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGAATTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATFGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGCTTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGCC  
GATTACGATTTTGGAGTGGTTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
TCCTCA

130 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGSTY  
YNPFLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTV  
SS

10 131 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAATGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

132 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQNGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-23

15 Anticuerpo U1-23

133 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGAATTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATFGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGCTTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGCG  
GATTACGATTTTGGAGTGGTTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCACCGTC  
TCCTC

134 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY  
YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTV  
S

135 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATTTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGAAAATCAAAC

5 136 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIKNDLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFRLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-24

137 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGTTGAGCTCTGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGATTTACTGTGCGAGAGCC  
GATTACGATTTTGGAAATGGTTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCGTGCTACCGTCT  
TCCTCA

10 138 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY  
YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWNGYFDYWGQGLVTV  
SS

139 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAATTACCCGTGGACGTTCCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGAAAATCAAAC

140 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIKNDLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFRLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

15

Anticuerpo U1-25

141 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC

ES 2 621 546 T3

TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGTATTAAGTGTGCGAGAGCC  
GATTACGATTTTGGAGTGGTTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTCA

142 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY  
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTV  
SS

143 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCA  
AGGTTACGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

5

144 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQNGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-26

145 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTAAGTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGTACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGGGCTCTGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGCC  
GATTACGATTTTGGAGTGGTTATTTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC  
TCCTC

10

146 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSGGSISSGDYYWSWIRQYPGKGLEWIGYIYYSGSTY  
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYFCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTV  
S

147 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCA  
AGGTTACGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGGTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

15 148 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNGYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-27

149 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGAATTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGTACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGGGCTCTGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGCC  
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
TCCTC

150 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQYPGKGLEWIGYIYYSGSTY  
YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYFCARADYDFWSGYDFWQGGLVTV  
S

5

151 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGGTTACCCGTGGACGTTCCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAATCAAAC

152 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIKNDLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFLTISSLPEDFATYYCLQHNGYPWTFGQGTKVEIK

10 Anticuerpo U1-28

153 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTGGTGAATTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGTATTTACTGTGCGAGAGCG  
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
TCCTCA

154 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY  
YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDSWGQGLVTV  
SS

15 Anticuerpo U1-28 155 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGATACCT  
GGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGGTTACCCGTGGACGTTCCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAATCAAAC

156 Proteína de la Cadena Ligera:

## ES 2 621 546 T3

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGIRNDLGWYQQIPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNGYPWTFGQGTTRVEIK

Anticuerpo U1-31

157 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC  
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAACTATGGTATCAGCTGGGTGCGGCAGGCC  
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACGATGGTTACAGAACTAT  
GCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGACCCTGCCTAC  
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGATGTT  
CAAGACTACGGTGACTACGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
TCCTCA

5 158 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFITNYGISWVRQAPGQGLEWMGWI SAYDGYRNY  
AQLKLRVMTMTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDVQDYGDYDFDYWGQGLVTV  
SS

159 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTCGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGTTATTTAAATGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGATTCAGGGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT  
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCCATCACCTTCGGCCAA  
GGGACACGACTGGAGATTAAA

10 160 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPS  
RFRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPIITFGQGTTRLEIK

Anticuerpo U1-32

161 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTTACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATGGGTACATCTATTACAGTGGGACCACCTAC  
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC  
GCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGCC  
GATTACGATTTTGGAGTGGTTATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  
TCCTCA

15 162 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPLQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGTTY  
YNPSLKRVTISVDTSKNQFALKLNSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTV  
SS

163 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGAGTCCAGGCATAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCCAGCGCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTTCCAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCTCTCTCACAACTCCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

164 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAGQGIRNDLGWYQQKPKAPQRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFSLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

5 Anticuerpo U1-35

165 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATATATTAGTAGTACTGGTAATAACATATACCAC  
GCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAGA  
TATAGTGGCTACGACGACCCTGATGGTFTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC  
GTCTCTTCA

166 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKLEWVSYISSSGNNIYH  
ADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGYDDPDGFDIWGQGTMTVT  
VSS

10 167 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCAGGCGAGTCCAGGACATAGCAACTATTTAAGTTGGTTTCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCAAGCTCCTGATCCAGATGCATCCAATTTGAAAACAGGGGTCCCTTCA  
AGGTTTCCAGTGGAGTGGATCTGGGACAGATTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGTATGATAATCCCCCGTGCAGTTTGGCCAG  
GGGACCAAGCTGGAGATCAAA

168 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLSWFQQKPKAPKLLIHDASNLETGVPS  
RFSGSGSGTDFTFITISLQPEDIATYYCQYDNPPCSFGQGTKLEIK

Anticuerpo U1-36

15 169 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC  
ACCTGCAGTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTTATTACTACTGGAGCTGGATCCGC  
CAGCACCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGACCACCTAC  
TACAATCCGTCCCTCAAGAGTCCAGTTACCATATCAGTAGACACCTCTAAGAACCAGTTC  
TCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACTGCCGCGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCC  
GATTACGATTTTGGAGTGGTCACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCCTGGTCACCGTC  
TCCTCA

170 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGYYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGTTY  
YNPSFKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGHFDYWGQGLVTV  
SS

171 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC  
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA  
GGGAAAGCCCCCTAAGCGCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGC AAAAGTGGGGTCCCATCA  
AGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT  
GAAGATTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

5 172 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGI RNDLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-37

173 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC  
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC  
CCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACGATGGTCACACAAACTAT  
GCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAACACAGCCTAC  
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACCCC  
CATGACTACAGTAACTACGAGGCTTTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCCCGTC  
TCCTC

10 174 Proteína de la Cadena Pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYDGH TNY  
AQKLQGRVTMTDTSNTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDPHDYSNYEA FDFWGQGLVTV  
S

175 ADN de la Cadena Ligera

atgagggtccctgctcagctcctggggctcctgctactctggctccgaggtgccagatgtg  
acatccagatgaccagctcctccatcctcctgctctgcatctgtaggagacagagtcaccat  
cacttgccgggcaagtcagagcattagcagttatttaaattgggtatcagcagaaaccagg  
aaagcccctaacctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatcaagat  
tcagtggcagtggtctgggacagatctcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaaga  
ttttgcaacttactactgtcaacagagttacagtacccccatcaccctcggccaagggaca  
cgactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatctcccgccatctgatg  
agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagaga  
ggccaaagtacagtggaaggtggataaacgcc

176 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPNLLIYAASSLQSGVPSR  
FSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQSYSTPITFGQGRLEIK

15

Anticuerpo U1-34

177 ADN de la Cadena Pesada:

accatggactggacctggagggtcctttcttgggtggcagcagcaacaggtgcccactccca  
ggltcagctgggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggctcct  
gcaaggcttctgggttacacctttaccaactatgggtacagctgggtgcggcaggccctgga  
caagggcttgagtggatgggatggatcagcgttacgatgggttacagaaactatgacagaa  
gctccagggcagagtcaccatgaccacagacacatccacgaccactgcctacatggagctga  
ggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgagagatggttcaagactacggt  
gactacgactactttgactactggggccagggaaccctgggtcaccgtctcctcagcttccac  
caagggcccatccgtcttccccctgggtgccctgctccaggagcaccctccgagagcacagccg  
ccctgggctgctgggtcaaggactacttccccgaaccg

178 Proteína de la Cadena Pesada

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWI SAYDGYRNYA  
QKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDVQDYGDYDYFDYWGQGLVTVSS

179 ADN de la Cadena Ligera:

cagctcctggggctcctgctactctggctccgaggtgccagatgtgacatccagatgacc  
agtctccatcctcctgtctgcatctgttaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaag  
tcagagcattagcagttatttaaattgggtatcagcagaaaccagggaagccccaacctc  
ctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatcaagatcagtgccagtgat  
ctgggacagatctcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagatcttgcaacttacta  
ctgtcaacagagttacagtagccccatcaccctcggccaagggaacagactggagattaaa  
cgaactgtggctgaccatctgtcttctcctcccgccatctgatgagcagtgaaatctg  
gaactgcctctgtttgtgtgctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagt  
gaaggtggataaacgcc

180 Proteína de la Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSR  
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPIITFGQGRLEIK

10 Anticuerpo U1-1

181 ADN de la Cadena Pesada:

catctgtgggtcttctcctcctgctgggtggcagctcccagatgggtcctgtcccagggtgcagc  
tgcaggagtcggggcccaggactgggtgaagccttcacagaccctgtccctcaccctgcactgt  
ctctgggtggctccatcaacagtggtgattactactggagctgga tccgcccagcaccagg  
aagggcctggagtggtatgggtacatctattacagtgggagcacctactacaaccgctcc  
tcaagagtcgagttaccaatcagtagacacgtctaaagaaccagttctccctgaagctgag  
ctctgtgactgccgcggacacggccgtgtattactgtgagagagcagattacgattttgg  
agtgggttactttgactactggggccagggaaccctgggtcaccgtctcctcagcctccacca  
agggcccatcggctcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacaacggc  
cctgg

182 Proteína de la Cadena Pesada

QVQLQESGPGLVKPSQTLTSLTCTVSGGSINSGDYYSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGSTYY  
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTVSS

15

183 ADN de la Cadena Ligera:

atgagggctccctgctcagctccctggggctcctgctgctctgggtccaggtgccagggtgtga  
catccagatgaccagctctccatccctccctgctctgcatctgtaggagacagagtcaccatca  
cttgccgggcaagtcagggcattagaatgatcttaggctgggtatcagcagaaaccagggaaa  
gccccaaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggctccatcaagggttcag  
cggcagtggtatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg  
caacttattactgtctacagcataatagttaccogtggacggttcggccaagggaaccaagggtg  
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt  
gaaatctggaactgcctctgttgctgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag  
tacagtggaaggtggataacgc

184 Proteína de la Cadena Ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGIKNDLWYQKPKGKAPKRLIYAASSLQSGVPSR  
FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

5 Anticuerpo U1-3

185 ADN de la Cadena Pesada:

tggttcttctctctgctgggtggcagctcccagatgggtcctgtcccagggtgcagctgcagga  
gtcggggccagactgggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtg  
gctccatcagcagtggtgggtactactggagctggatccgccagcaccaggggaaggcctg  
gagtggtattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaaccctccctcaagagtcg  
agttaccatatacagtagacacgtctaaagaaccagttctcccgaagctgagctctgtgactg  
ccgcgacacggccgtgtattactgtgagagatggctatgatagtagtggttattaccac  
ggctactttgactactggggccagggaaaccctggtcaccctctcctcagcctccaccaaggg  
cc

186 Proteína de la Cadena Pesada

QVQLQESGPGLVKPSQTLISLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGSTYY  
NPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDGYDSSGYYHGYFDYWGQGLTVT  
VSS

10 187 ADN de la Cadena Ligera:

H3\_130\_1N1K

caggctctcatttctctgcttggctctggatctctgggtgcctacggggacatcgatgaccc  
agtctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcaagtcag  
ccagagtggtttatacagctccaacaataagaactacttagcttgggtaccagcagaaacca  
ggacagcctccaaagctgctcatttactgggcattaccgggaatccggggctccctgacc  
gattcagtgccagcgggtctgggacagattcactctcaccatcagcagcctgcaggctga  
agatgtggcagtttattactgtcagcaatattatagtaactccgctcactttcggcggaggg  
accaagggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctg  
atgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgctgctgctgaataacttctatcccag  
agaggccaaagtacagtggaaggtggataacgc

188 Proteína de la Cadena Ligera:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQKPGQP PKLLIYWASTRE  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-4

H3\_133\_1N1G1

189 ADN de la Cadena Pesada

ctgtgggtctctcctcctgctgggtggcagctcccagatgggtcctgtcccagggtgcagctgca  
ggagtcgggcccaggactgggtgaagccttcacagaccctgtccctcactgcactgtctctg  
gtggctccatcagtagtggtgattactactggagctggatccgccagcaccagggaagggc  
ctggagtggaattgggtacatctattacagtgaggacacctactacaaccgtccctcaagag  
tcgagttaccatacagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagttgagctctgtga  
ctgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagccgattacgatctttggagtggttat  
tttgactactgggcccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggccatc  
ggtcttccccctggcaccctc

5 190 Proteína de la Cadena Pesada

QVQLQESGPGLVKPSQTLTLCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY  
NPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTVSS

191 ADN de la Cadena Ligera

H3\_133\_1N1K

gtgcccgcctcagcgcctggggctcctgctgctctgggtcccagggtgccaggtgtgacatcc  
agatgaccagctcctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttg  
ccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggatcagcagaaaccagggaagcc  
cctaagcgcctgactctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatcaaggctcagcg  
gcagtggaatcgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttgc  
aacttattactgtctacagcataataattaccctggacgcttcggccaagggaaccaaggtg  
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagb  
tgaaatctggaactg

10 192 Proteína de la Cadena Ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVTTTCRASQGIRNDLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPSRF  
SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-5

193 ADN de la Cadena Pesada:

H3\_138\_1N1G1

tggtctctcctctctgctgggtggcagctcccagatgggtcctgtcccagggtgcagctgcagga  
gtcgggcccaggactgggtgaagccttcacagaccctgtccctcactgcactgtctctggtg  
gctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcaccagggaagggcctg  
gagtggaattgggtacatctattacagtgaggacacctactacaaccgtccctcaagagtcg  
agttaccatatacagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactg  
ccgcggacacggccgtgtatttctgtgcgagagccgattacgatctttggagtggttatctt  
gactactggggcccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcc

15 194 Proteína de la Cadena Pesada

QVQLQESGPGLVKPSQTLTLCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYYN  
PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYFCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTVSS

195 ADN de la Cadena Ligera:

H3\_138\_1N1K

atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtga  
catccagatgaccagctctccatcctccctgctgcatctgtaggagacagagtcaccatca  
cttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggatcagcagaaaccagggaaa  
gccccctaagcgctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatcaaggttcag  
cggcagtggtctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg  
caacttattactgtctacagcataaacttaccogtggacgttcggccaagggaccaaggtg  
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccaatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt  
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag  
tacagtggaaggtggataaacgc

5 196 Proteína de la Cadena Ligera

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFLTISSLQPEDFATYYCLQHNTYPTWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-6

197 ADN de la Cadena Pesada:

H3\_162\_1N1G1

tggttcttctctctgctgggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcagga  
gtcgggcccaggactgggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtg  
gctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcaccaggggaagggcctg  
gagtggtattgggtacatctattacagtgggagcactactacaaccogtccctcaagagtctg  
agttaccatatacagtagacagctctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactg  
ccgcggaacacggcctgtatttctgtgctgagagccgattacgatttttggaatggttatttt  
gactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggccc

10

198 Proteína de la Cadena Pesada

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSYSTY  
YNPFLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYFCARADYDFWNGYFDYWGGTLVTV  
SS

199 ADN de la Cadena Ligera:

H3\_162\_1N1K

atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtga  
catccagatgaccagctctccatcctccctgctgcatctgtaggagacagagtcaccatca  
cttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggatcagcagaaaccagggaaa  
gccccctaagcgctgatctatgctgcttccagtttgcaaagtgggtcccatcaaggttcag  
cggcagtggtctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg  
caacttattactgtctacagcataaacttaccogtggacgttcggccaagggaccaaggtg  
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccaatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt  
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag  
tacagtggaaggtggataaacgc

15

200 Proteína de la Cadena Ligera

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFLTISSLQPEDFATYYCLQHNTYPTWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-8

201 ADN de la Cadena Pesada:

H3\_174\_1N1G1

ttggtggcagcagctacaggcacccacgcccagggtccagctgggtacagctctggggctgagg  
gaagaagcctggggcctcagtggaaggtctcctgcaaggtttccggatacacccctcactgaat  
tatccatgtactgggtgacagcagctcctggaaaagggttgagtggatgggagggtttgat  
cctgaagatggtgaaacaaictacgcacagaaggtccagggcagagtcaccatgaccgagga  
cacatctacagacacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacaaggcctgt  
attactgtgcaactgggtggaactacgtctttgactactggggccagggaaccctggtcacc  
gtctcctcagcctccaccaagggtccc

5 202 Proteína de la Cadena Pesada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTELSMYWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYA  
QKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGWNVYFDYWGQGLVTVSS

203 ADN de la Cadena Ligera:

H3\_174\_1N1K

ggatccagtggggatatgtgatgactcagctcctcctcctcctgcccgtcaccctggaga  
gcccggcctccatctcctgcagggtccagtcagagcctcctgcatagtaatggatacaactatt  
tggattggtacctgcagaagccagggcagctcctcacagctcctgatctatttggattctcat  
cgggcctccgggtccttgacaggttcagtgccagtggtcaggcacagattttacactgaa  
aatcagcagagtgaggctgaggatgttgggggtttattactgcatgcaagctctacaaactc  
cgctcactttcggcggaggggaccaaggtggagatcaaacgaaactgtggctgcaccatctgtc  
ttcatcttcccgcct

10 204 Proteína de la Cadena Ligera

DIVMTQSPLSLPVPPEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLDSHRA  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-11

205 ADN de la Cadena Pesada:

H3\_178\_1N1G1

tggttcttctctctgctgggtggcagctcccagatgggtcctgtcccagggtgcagctgcagga  
gtcggggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtcctcactgcactgtctctgggtg  
gctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccggcagcaccaggggaaggcctg  
gagtggtattgggtacatctattacagtgggagcaccctactacaaccgctcctcaagagtgc  
agttaccatatacagtagacacgtctaagaaccagttctcctgaaagctgagctctgtgactg  
ccgcggacacggcctgtatttctgtgcgagagccgattacgatttttggagtggttattt  
gactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggtccatcagag  
tcttcccctgg

15

206 Proteína de la Cadena Pesada

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPKGLEWIGYIYYSGSTY  
YNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYFCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTV  
SS

207 ADN de la Cadena Ligera:

H3\_178\_1N1K

atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctgggtcccagggtgccagggtgtg  
acatccagatgaccagctcctccatcctcctgctgcatctgtaggagacagagtcacat  
cacttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctgggtatcagcagaaaccaggg  
aaagcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatcaaggt  
tcagcggcagtggtatctgggacaaaattcactctcactatcagcagcctgcagcctgaaga  
ttttgcaacttattactgtctacagcataatacttaccctgggacgttcggccaagggacc  
aagggtggaaatcagacgaactgtggctgcaccatctgtcttca tcttcccgccatctgatg  
agcagttgaaa tctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaa taacttctatcccagaga  
ggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcc

208 Proteína de la Cadena Ligera

5 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIKNDLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTKFETLTISLQPEDFATYYCLQHNTYPTWTFGQGTKVEIR

Anticuerpo U1-16

209 ADN de la Cadena Pesada:

H3\_221\_1N1G1

accatgaaacatctgtggtctctcctcctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtccc  
agggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaaaccttcacagaccctgtcccctcac  
ctgcactgtctctggtggctccatcagcagtggtgat tactactggagctggatccgcccag  
caccaggggaagggcctggagtggtattgggtacatctat tacagtgaggacactactaca  
acccgtcccctcaagagtcgagttaccata tcagtagacacgtctaaagaaccagttctccct  
gaagctgagctctgtgactgocgggacacggccgtgtattactgtgcgagagcggattac  
gatttttggagtggttattttgactactggggccagggaatcctgggtaccgtctcctcag  
cctccaccaagggcccatcgggtcttccccctggcaccctcctccaagaacacctctggggg  
cacagcggccctgggtgctgctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcctgg  
aactcaggcgcctg

10 210 Proteína de la Cadena Pesada

QVQLQESGPGLVKPSQTLISLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGSTYY  
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWQQGILVTVSS

211 ADN de la Cadena Ligera:

H3\_221\_1N1K

atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctgggtcccagggtgccagggtgtg  
gacatccagatgaccagctcctccatcctcctgctgcatctgtaggagacagagtcacc  
atcacttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctgggtatcagcagaaacca  
gggaaagccccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatca  
aggttcagcggcagtggtatctgggacagaaattcactctcacaatcagcagcctgcagcct  
gaagattttgcaacttattactgtctacagcataatagttaccctgggacgttcggccaa  
gggaccaaggtggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcca  
tctgatgagcagtgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaaataacttctat  
cccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcc

15 212 Proteína de la Cadena Ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIKNDLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPSR  
RSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-17

213 ADN de la Cadena Pesada:

H3\_224\_1N1G1

tggttcttccctctgctgggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggctgcagctgcagg  
agtccggcccaggactgggtgaagccttcacagaccctgtccctcaccctgcactgtctctgg  
tggctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcaccaggaagggc  
ctggagtggattggaatacattacagtgaggacacctactacaattcgtccctcaaga  
gtcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgt  
gactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagccgattacgatttttggagtggg  
tattttgactactggggccaggaaccctgggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcc  
catcg

5 214 Proteína de la Cadena Pesada

QVQLQESGPGLVKPSQTLISLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYSGSTYY  
NSSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTVSS

215 ADN de la Cadena Ligera:

H3\_224\_1N1K

ggtgccagggtgtgacatccagatgacccagctctccatcctcctgtctgcatctgtaggag  
acagagtcaccatcacttgcggggcaagtcagggcaattagaaatgatttaggtggatca  
gcagaaacctgggaaagccctaaagcgcctgatctatgctgcattccagtttgcaaagtggg  
gtcccatcaaggttcagcggcagtggtctgggacagaattcactctcacaatcagcagcc  
tgcagcctgaagattttgcaacttattactgtctacagcacaatagttaccctggacgtt  
cggccaagggaccaaggtggaaatcaaaccgaactgtggctgcaccatctgtctcatctc  
ccgcca

10 216 Proteína de la Cadena Ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-18

217 ADN de la Cadena Pesada:

H3\_227\_1N1G1

aggttcttccctctgctgggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggctgcagctgcagg  
agtccggcccaggactgggtgaagccttcacagaccctgtccctcaccctgcactgtctctgg  
tggctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcaccaggaagggc  
ctggagtggattggatacattacagtgaggacacctactacaaccctcctcaaga  
gtcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgt  
gactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagccgattacgatttttggagtggg  
tattttgactactggggccaggaaccctgggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcc  
catcgggtcttcccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctggg  
ctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtctgtggaactcagggcctc

15 218 Proteína de la Cadena Pesada

QVQLQESGPGLVKPSQTLISLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYSGSTYY  
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTVSS

219 ADN de la Cadena Ligera:

H3\_227\_1N1K

atgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctgggttcccagggtgccagggtgtga  
catccagatgaccaggtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca  
cttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggatcagcagaaaccagggaaa  
gcccctaagcgctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatcaaggttcag  
cggcagtggtctctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg  
caacttattactgtctacagcataatagttaccctgggacgttcggccaagggaaccaagggtg  
gaaatcaaacgaaactgtggctgcaccatctgtcttcaatctcccggcctctgatgagcagtt  
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataactcttatcccagagaggccaag  
tacagtggaaagtgataacg

220 Proteína de la Cadena Ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIKNDLGWYQQKPKGKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

5 Anticuerpo U1-33

221 ADN de la Cadena Pesada:

H4\_14\_1N1G4

ctgtgggtctctccctctctgctgggtggcagctcccagatgggtctctgcccagggtgcagctgc  
aggagtccgggcccaggactgggtgaagccttcacagaccctgtccctcactgcactgtctc  
tgggtggctccatcagcagtggtgatctactctggagctggatccgccagcaccagggaag  
ggcctggagtggtattgggtacatctattacagtgaggacactactacaaccctccctca  
agagtcaggttacatgctcagtagacacgctcagaaccagttctccctgaagctgagctc  
tgtgactgcccggacacggccgtgtatctactgtgagagagccgatcagatctttggagtg  
ggcactttgactgctggggccagggaaccctggteaccgtctcctcagcttccaccaagg  
gccccatccgtcttcccc

222 Proteína de la Cadena Pesada

10 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY  
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARADYDFWSGHFDCWQGTLLVTVSS

223 ADN de la Cadena Ligera:

H4\_14\_1N1K

atgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctgggttcccagggtgccagggtgtga  
catccagatgaccaggtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca  
cttgccgggcaagtcagggcattagagatgatttaggctggatcagcagaaaccagggaaa  
gcccctaagcgctgatctatgctgaatccagtttgcaaagtgggtcccatcaaggttcag  
cggcagtggtctctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg  
caacttattactgtctacagcatcattagttaccctgggacgttcggccaagggaaccaagggtg  
gaaatcaaacgaaactgtggctgcaccatctgtcttcaatctcccggc

224 Proteína de la Cadena Ligera

15 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIKRDLDGWYQQKPKGKAPKRLIYAESSLQSGVPSR  
FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-29

225 ADN de la Cadena Pesada:

H4\_107\_1N1G4

tggctgagctgggttttccctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgctcaggtgcagctgg  
tggagctctgggggagggcgtggccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtc  
tggattcaccctcaatagctatgacatgcactgggtccgcccaggtccaggcaagggcgtg  
gagtggtggcagttatatggtatgatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaagg  
gccgattcaccatctctagagacaattccaagaacacgctgta tctgcaaa tgaacagcct  
gagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagaccgcttggtactaatggtgta  
tgctatgaagactacggtatggacgtctggggccaagggaccacggctcaccgtctcctcag  
cttcaccaagggcccatccgctctccccctggcgcctgtccagfagcaccctccgagag  
cacagccgcccctgggc

5 226 Proteína de la Cadena Pesada

QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFNSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYIA  
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDRLCTNGVCYEDYGMDVWGQGTTV  
TVSS

227 ADN de la Cadena Ligera:

H4\_107\_1N1K

atgagggctccctgctcagctcctggggctcctgctgctctggctctcaggtgccagatgtga  
catccagatgaccagctctccatectccctgtctgcatctgttaggagacagagtcaccatca  
cttgccaggcagtcaggacattagcaactatttaaattgggtatcagcagaaaccagggaaa  
gccccaaaggctcctgatctacgatgcatccaatttggaacaggggtcccatcaaggttcag  
tggaaagtgga tctgggacagat tttacttccaccatcagcagcctgcagcctgaagatgttg  
caacata t tactgtcaacactatgatactctcccgcctcacttccggcggagggaccaaggtg  
gagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtctctcatctcccggca tctgatgagcagtt  
gaaatctggaactgcccctgttctgtgtgctgtaataacttctatcccagagagggccaaag  
tacagtgg

10

228 Proteína de la Cadena Ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCQASQDISNYLNWYQQKPKAPKVLJYDASNLETGVPSR  
FSGSGSGTDFFTISSLQPEDVATYYCQHYDTLPLTFGGGTRVEIK

Anticuerpo U1-30

229 ADN de la Cadena Pesada:

15 H4\_116\_1\_1N1G4

ggactgtgcaagaacatgaaacacctgtggttcttccctcctgctgggtggcagctcccagatg  
ggctcctgtcccaggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactgg tgaagcctttacagacc  
tgctccctcacctgcactgtctctgggtgctccatcagcagtggtgattactactggagctgg  
atccgccagcaccaggggaagggcctggagtgga ttgggtacatctattacagtgggaccac  
ctactacaaccctcctc caagagtcgagttaccatatacagtagacaagcttaagaaccagt  
tcgcccctgaagctgaactctgtgactgcccgggacacggccgtgtattactgtgcgagagcc  
gattacgatttttgagtggttattttgactactggggccagggaaaccctggctaccgctctc  
ctcagcttccaccaagggcccctccgctcttccccctgg

## ES 2 621 546 T3

### 230 Proteína de la Cadena Pesada

QVQLQESGPGLVKPLQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGTTY  
NPSLKSRVTISVDTSKNQFALKLNSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGLVTVSS

### 231 ADN de la Cadena Ligera:

#### H4\_116\_1\_1N1K

atgaggggtccctgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtg  
acatccagatgacccagctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccat  
cacttgccgggcaggtcagggcattagaaatgatttaggctggatcagcagaaaccaggg  
aaagcccctcagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatcaaggt  
tcagcggcagtggtctgggacagaattctctctcacaatctccagcctgcagcctgaaga  
ttttgcaacttattactgctctacagcataatagttaccctggacgttcggccaaggacc  
aaggtggaaatcaaacgaaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatg  
agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaaacttctatcccagaga  
ggccaaagtacagtggagggtggataacgcccttccaatcggg

5

### 232 Proteína de la Cadena Ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRAGQGIRNDLGWYQQKPGKAPQRLIYAASSLQSGVPSR  
FSGSGSGTEFSLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

## LISTA DE SECUENCIAS

Cebador (SEQ ID N°: 233): CGGGATCCATGTCCTAGCCTAGGGGC

Cebador (SEQ ID N°: 234): GCTCTAGATTAATGATGATGATGATGATGTTGTCCTAAA

Tabla de secuencias de CDR

Cadena de Ab	Pat. ID:	CDR1	CDR2	CDR3
pesada	U1-1	GGINSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
pesada	U1-2	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLRS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNGYPWT
pesada	U1-3	GGISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	DGYDSSGYYHGYFDY
ligera		KSSQSVLYSSNNKNYLA	WASTRES	QQYYSTPLT
pesada	U1-4	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNNYPWT
pesada	U1-5	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNTYPWT
pesada	U1-6	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWNGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNTYPWT
pesada	U1-7	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQDIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
pesada	U1-8	GYTLTELSMY	GFDPEDGETIYAQKFQG	GWNYVFDY
ligera		RSSQSLLSHNGYNYLD	LDSHRAS	MQALQTPLT
pesada	U1-9	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWNGYFDY
ligera		RASQDIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
pesada	U1-10	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNNYPWT
pesada	U1-11	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNTYPWT
pesada	U1-12	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNNYPWT
pesada	U1-13	GGISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	EDDGMDV
ligera		RSSQSLLSHNGYNYLE	LGSNRAS	MQALQTPIT
pesada	U1-14	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNTYPWT
pesada	U1-15	GGSVSSGGYYWS	YIYYSGSTNYNPSLKS	DGDVDTAMVDAFDI
ligera		RASQSLSGNYLA	GASSRAT	QQYDRSPLT
pesada	U1-16	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
pesada	U1-17	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNSSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
pesada	U1-18	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
pesada	U1-19	GGISSYDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	GDYDFWSGEFDY
ligera		secuencia no disponible		

ES 2 621 546 T3

Cadena de Ab	Pat. ID:	CDR1	CDR2	CDR3
pesada	U1-20	GGSISSGGYYWS	YIYDSGSTYYNPSLKS	DQQQDGYSYGYGYYYGMDV
ligera		QASQDISNYLN	VASNLET	QQCDNLPLT
pesada	U1-21	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQDIRNDLG	AASRLQS	LQHNSYPWT
pesada	U1-22	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQN	LQHNSYPWT
pesada	U1-23	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
pesada	U 1-24	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWNGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNNYPWT
pesada	U1-25	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQN	LQHNSYPWT
pesada	U1-26	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDF
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNGYPWT
pesada	U1-27	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDF
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNGYPWT
pesada	U1-28	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDS
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNGYPWT
pesada	U1-29	GFTFNSYDMH	VIWYDGSNKYYADSVKG	RLCTNGVCYEDYGMDV
ligera		QASQDISNYLN	DASNLET	QHYDTLPLT
pesada	U1-30	GGSISSGDYYWS	YIYYSGTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RAGQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
pesada	U1-31	GYTFTNYGIS	WISAYDGYRNYAQLQGG	DVQDYGDYDYFDY
ligera		RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPIT
pesada	U1-32	GGSISSGDYYWS	YIYYSGTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
ligera		RAGQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
pesada	U1-33	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGHFDC
ligera		RASQGIRDDL	AESSLQS	LQHHSYPWT
pesada	U 1-34	GYTFTNYGIS	WISAYDGYRNYAQLQGG	DVQDYGDYDYFDY
ligera		RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPIT
pesada	U1-35	GFTFSDYYMS	YISSGNNIYHADSVKG	ERYSGYDDPDGFDI
ligera		QASQDISNYLS	DASNLET	QQYDNPPCS
pesada	U1-36	GGSISSGYYWS	YIYYSGTYYNPSFKS	ADYDFWSGHFDF
ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
pesada	U1-37	GYTFTSYGIS	WISAYDGHTNYAQLQGG	DPHDYSNYEAFDF
ligera		RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPIT
pesada	U1-38	GFSLSTSGVGVG	LIYWDDDKRYSPSLKS	RDEVRGFDY
ligera		RSSQSLVYSDGYTYLH	KVSNWDS	MQGAHWPI
pesada	U1-39	GFTVSSNYMS	VIYSGGSTYYADSVKG	GQWLDV
ligera		RSSQSLLSNGYNYLD	LGFRAS	RQALQTPLT
pesada	U1-40	GGSISSGGYYWS	YIYSSGSTYYNPSLKS	DRELELYYYYYGMDV
ligera		RSSQSLLSNGYNYLD	LGSNRAS	MQALQTPLT
pesada	U1-41	GGSISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	DRELEGYSNYYGVDV

ES 2 621 546 T3

Cadena de Ab	Pat. ID:	CDR1	CDR2	CDR3
ligera		RASQAISNYLN	AASSLQS	QQNNSLPIT
pesada	U1-42	GYSFTSYWIG	IIPGDS DTRYSPSFQG	HENYGDYNY
ligera		RASQSIRSYLN	AASSLQS	QQSNGSPLT
pesada	U1-43	GGSISSGGYYWS	YIYSGSTYYPNSLRS	DREREWDYDYGDPQGM DV
ligera		RASQISSYLH	AASSLQS	QQSYSNPLT
pesada	U1-44	GYSFTSYWIG	IIPGDS DTYSPSFQG	HENYGDYNY
ligera		RASQSIRSYLN	AASSLQS	QQSISPLT
pesada	U 1-45	GYTFTSYDIN	WMNPNSGDTGYAQVFQG	FGDLPYDYSYEWFD P
ligera		RASQISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPLT
pesada	U1-46	GDSVSSNSAAWN	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	DLYDFWSGYPYYYGMDV
ligera		secuencia no disponible		
pesada	U1-47	GDSVSSNSAAWN	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	DYYGSGSFYYYYGMDV
ligera		RASQISSYLN	AASNLQS	QQSYSTPRT
pesada	U1-48	GGSISSYYWS	HIYTS GSTNYNPSLKS	EAFVGVGPYYYGMDV
ligera		secuencia no disponible		
pesada	U1-49	GYTFTGYMH	WINPNIGGTNCAQKFQG	GGRYSSWSYYYYGMDV
ligera		KSSQSLLLSDGGTYLY	EVS NRFS	MQSMQLPIT
pesada	U1-50	GGSVSSGGYYWS	YIYSGSTNYNPSLKS	GGDSNYEDYYYYY GMDV
ligera		RASQSISIYLH	AASSLQS	QQSYTSPIT
pesada	U1-51	GGSISSYYWS	YIYSGSTNYNPSLKS	DSSYDSSGYLYYYAM DV
ligera		KSSQSVLYSSNNKNYLA	WASTRES	QQYTTPLT
pesada	U1-52	GGSISSGGYYWS	NIYSGSTYYPNSLKS	GGTGTNYYYYGMDV
ligera		RASQSVSSSYLA	GASSWAT	QQYGSSPLT
pesada	U1-53	GFTFSIYSMN	YISSSSSTIYADSVKG	DRGDFDAFDI
ligera		QASQDITNYLN	DASNLET	QQCENFPIT
pesada	U1-55.1	GGSVSSGGYYWN	YINYS GSTNYNPSLKS	DRELELYYYYGMDV
ligera		will be same as U1-55		
pesada	U1-55	will be same as U1-55.1		
ligera		RSSQSLLYSNGYKYLD	LGSNRAS	MQALQTPIT
pesada	U1-57.1	will be same as U1-57		
ligera		RSSQSLLYSNGYKYLD	LGSNRAS	MQALQTPIT
pesada	U1-57	GGSVSSGGYYWN	YINYS GSTNYNPSLKS	DRELELYYYYGMDV
ligera		will be same as U1-57.1		
pesada	U 1-58	GFTFSSYGMH	VIWYDGSNKYYADSVKG	AARLDYGYGMDV
ligera		RASQSINSYLN	GASGLQS	QQSYSSPLT
pesada	U1-59	GGFSGYYWS	EINHSGSTNYNPSLKS	DKWTWYFDL
ligera		RSSQSVLYSSSNRNYLA	WASTRES	QQYYSTPRT
pesada	U1-61.1	GVSISGGYYWS	YIYSGSTYYPNSLKS	DSESEYSSSSNYGMDV
ligera		RASQTISSYLN	AASSLQG	QQSYSNPLT
pesada	U1-61	GVSISGGYYWS	YIYSGSTYYPNSLKS	DSESEYSSSSNYGMDV
ligera		will be the same as U1-61.1		
pesada	U1-62	GYSFTSYWIG	IIPGDS DTRYSPSFQG	QMAGNYYYGMDV
ligera		RASQSVISIYLA	GASSRAT	QQYGSSPCS

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado que se une a HER-3, que comprende  
 5 una CDR1 de la cadena pesada representada por GGSFSGYYWS, una CDR2 de la cadena pesada representada por EINHSGSTNYNPSLKS y una CDR3 de la cadena pesada representada por DKWTWYFDL, y  
 una CDR1 de la cadena ligera representada por RSSQSVLYSSSNRNYLA, una CDR2 de la cadena ligera representada por WASTRES y una CDR3 de la cadena ligera representada por QQYYSTPRT.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID N°: 70 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID N°:72.
- 15 3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado según la reivindicación 1 o 2, que es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multiespecífico o un fragmento de anticuerpo del mismo, en donde el fragmento de anticuerpo es preferiblemente un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fv, un diacuerpo o una molécula de anticuerpo monocatenaria.
- 20 4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho anticuerpo aislado es del tipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 25 5. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo está acoplado a un grupo de etiquetaje, que es preferiblemente un radioisótopo o radionúclido, un grupo fluorescente, un grupo enzimático, un grupo quimioluminiscente, un grupo biotinilado o un epítipo polipeptídico predeterminado.
- 30 6. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se acopla a un grupo efector, que preferiblemente es un radioisótopo o radionúclido, una toxina o un grupo terapéutico o quimioterapéutico, en donde el grupo terapéutico o quimioterapéutico se selecciona, p. ej., del grupo que consiste en caliqueamicina, auristatina-PE, geldanamicina, maitansina y sus derivados.
- 35 7. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la molécula de ácido nucleico preferiblemente está conectada operativamente a una secuencia de control.
- 40 8. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7.
9. Una célula hospedadora transformada con el vector según la reivindicación 8.
- 45 10. Un procedimiento para preparar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende la etapa de aislar dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora preferiblemente es una célula de mamífero, una célula vegetal, una célula fúngica o una célula procariótica.
- 50 11. Una composición farmacéutica que comprende como un agente activo al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado según una de las reivindicaciones 1-6 y un portador, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
12. La composición farmacéutica según la reivindicación 11, adecuada para uso terapéutico.
13. La composición farmacéutica según la reivindicación 11, adecuada para uso diagnóstico.
- 55 14. Uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en un método para diagnosticar una enfermedad asociada con HER-3, particularmente una enfermedad hiperproliferativa, que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de estómago, cáncer endometrial, cáncer de las glándulas salivares, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga urinaria, glioma, melanoma, otros cánceres que expresan o sobreexpresan HER-3, cáncer de testículo, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de cabeza y cuello y formación de metástasis tumorales, comprendiendo el método:
- 60 (a) poner en contacto una muestra con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, bajo condiciones adecuadas para permitir la unión de dicho anticuerpo a HER-3; y

(b) identificar la unión de dicho anticuerpo a HER-3.

15. El uso según la reivindicación 14, en el que dicha enfermedad hiperproliferativa está asociada con un incremento de la fosforilación de HER-3, un incremento de la heterodimerización de HER-2/HER-3 o un incremento de la actividad de PI<sub>3</sub>-cinasa, cinasa c-jun-terminal, AKT, ERK2 y/o PYK2.

5 16. Un estuche que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

10 17. El estuche según la reivindicación 16, que comprende un agente terapéutico adicional, en donde el agente terapéutico adicional es preferiblemente un agente antineoplásico, p. ej. un anticuerpo antitumoral o un agente quimioterapéutico.

Fig. 1

línea celular	tejido	nivel de expresión	línea celular	tejido	nivel de expresión
Hs578T	mama	++	RPMI-7951	melanoma	O/+
T47D	mama	++	MelJuso	melanoma	++
SKBr3	mama	+++	MelGerlach	melanoma	++
ZR 75-1	mama	++	C32	melanoma	+++
MDA-MB-435s	mama	+++	HT144	melanoma	+++
MCF-7	mama	++	SK-Mel2	melanoma	+++
BT474	mama	+++	MALME3	melanoma	+++
MDA-MB 453	mama	+++	Hs294T	melanoma	+++
MDA-MB 361	mama	++	A375p	melanoma	+++
HCT116	colon	+	SK-Mel3	melanoma	+++
HT29	colon	++	SK-Mel5	melanoma	++
LoVo		+	KB	nasofaringeo	+
CaCo-2	colon	+	SCC9	Carcinoma de células escamosas	+
SW480	colon	++	SKOV3	ovario	+
A431	epidermoide	+	Capan-1	páncreas	+
HT1080	fibrosarcoma	O/+	Capan-2	páncreas	+
CaKi-1	riñón	O	Bx-PC-3	páncreas	+
CaKi-2	riñón	O	LNCap	próstata	++
Calu6	pulmón	O	DU145	próstata	+
A549	pulmón	O	PC-3	próstata	+
M19	melanoma	++	BM1604	próstata	++
M14	melanoma	+++	TSU	próstata	+

0 = sin expresión; + = débil; ++ = media; +++ = fuerte

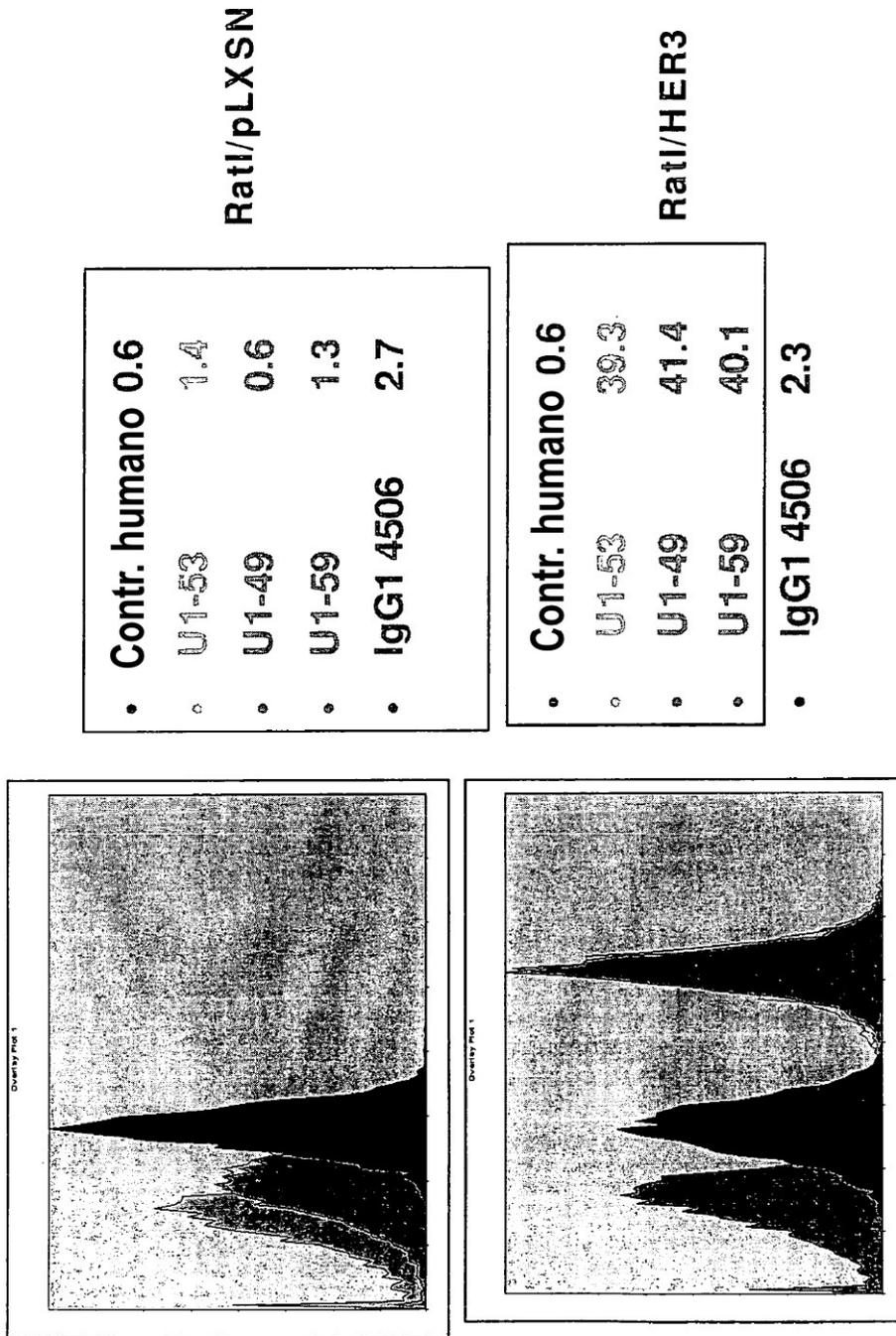
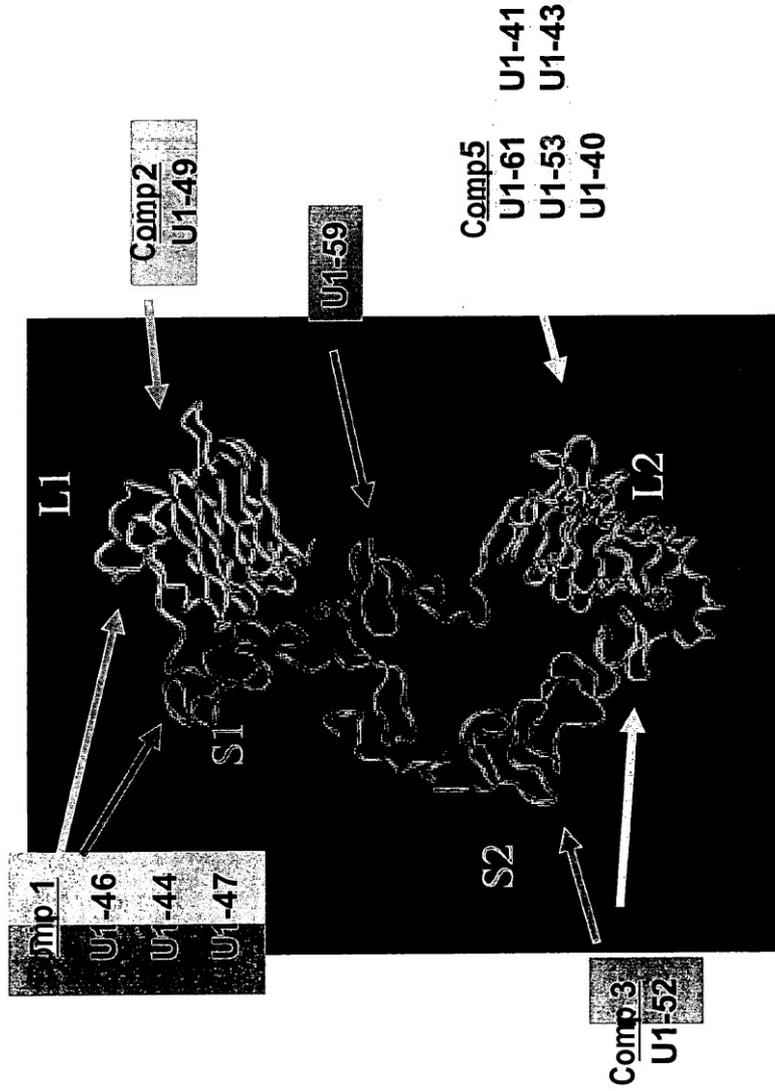


Fig. 2

**Fig.3** Compartimentos de anticuerpos



**Fig. 4**  
FACS scatchard

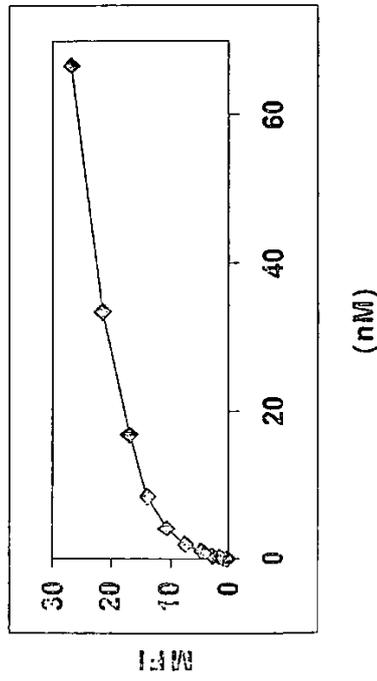
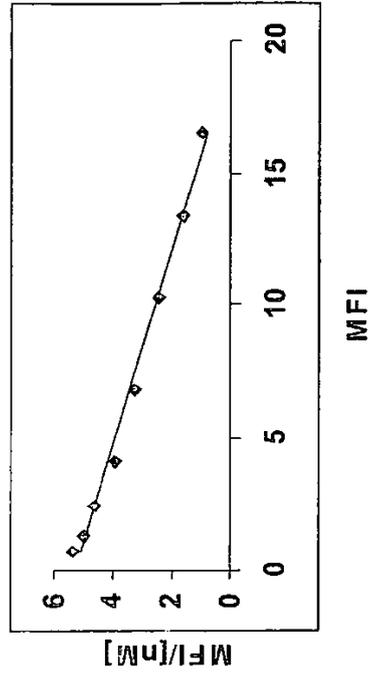
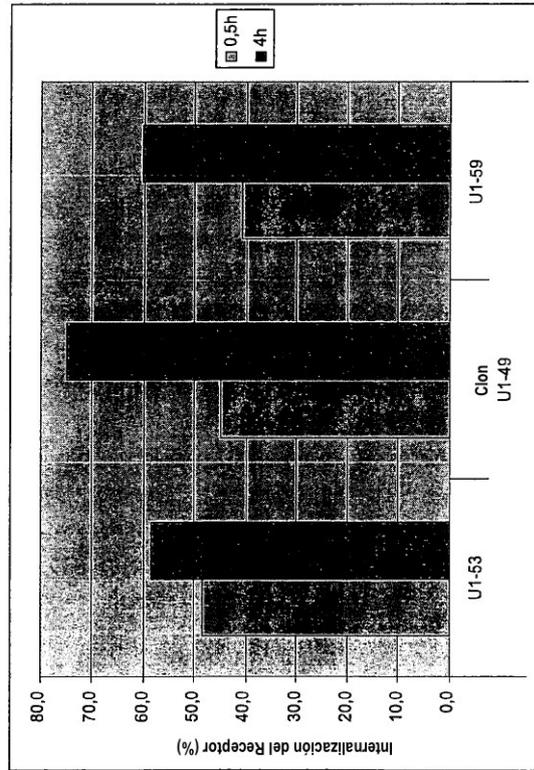
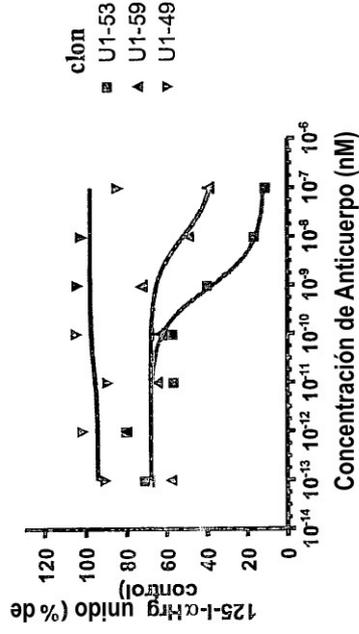


Fig. 5  
internalización

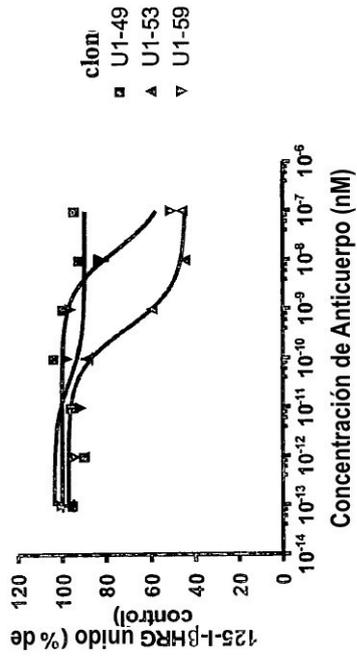


**Fig. 6a** bloqueo de HRG



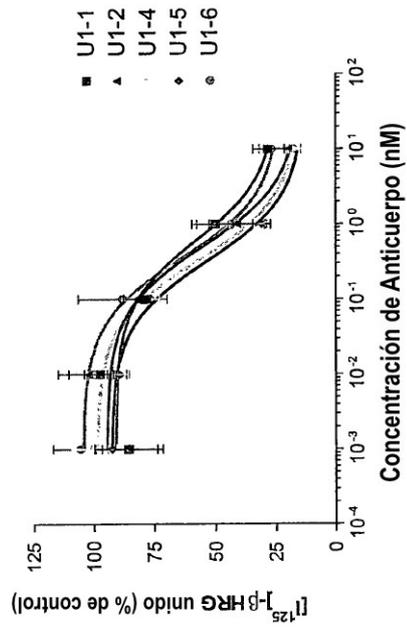
clon	EC50 (nM)
U1-59	9,65
U1-49	-
U1-53	0,71

**Fig. 6b** bloqueo de HRG



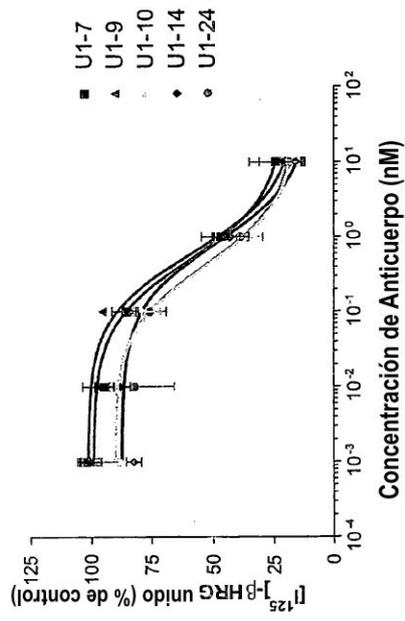
clon	EC50 (nM)
U1-59	32,1
U1-49	-
U1-53	0,49

Fig. 6c



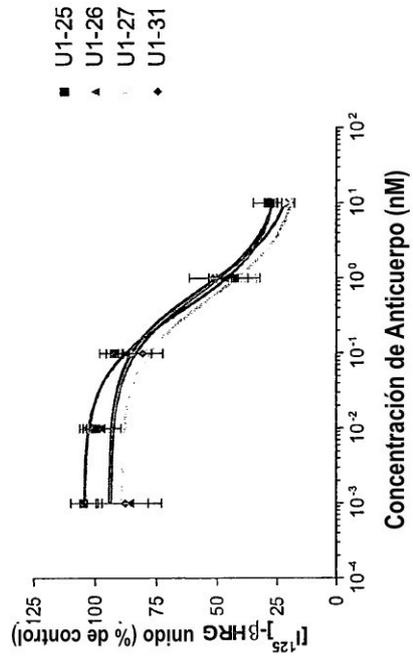
clon	EC <sub>50</sub> (nM)
U1-1	0.61
U1-2	0.51
U1-4	0.32
U1-5	0.33
U1-6	0.35

Fig. 6d



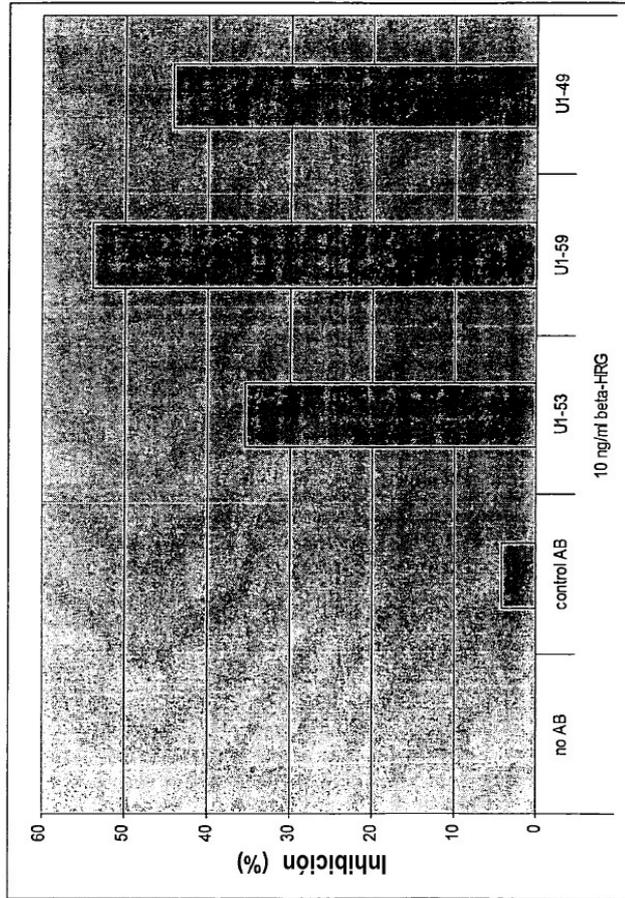
clon	EC50 (nM)
U1-7	0.49
U1-9	0.60
U1-i0	0.40
U1-14	0.83
U1-24	0.41

Fig. 6e



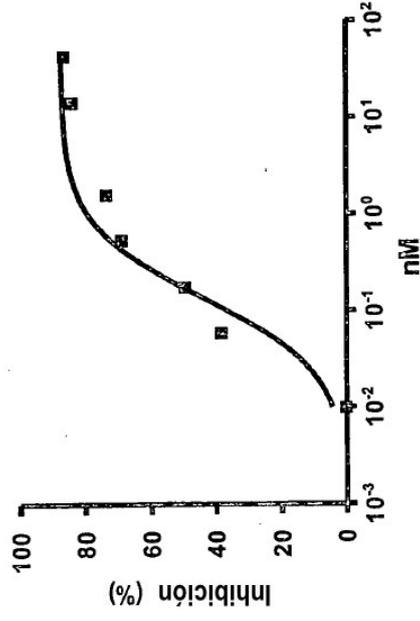
clone	EC50 (nM)
U1-25	0.38
U1-26	0.60
U1-27	0.56
U1-31	0.77

**Fig. 7a** fosforilación de tirosina HER3



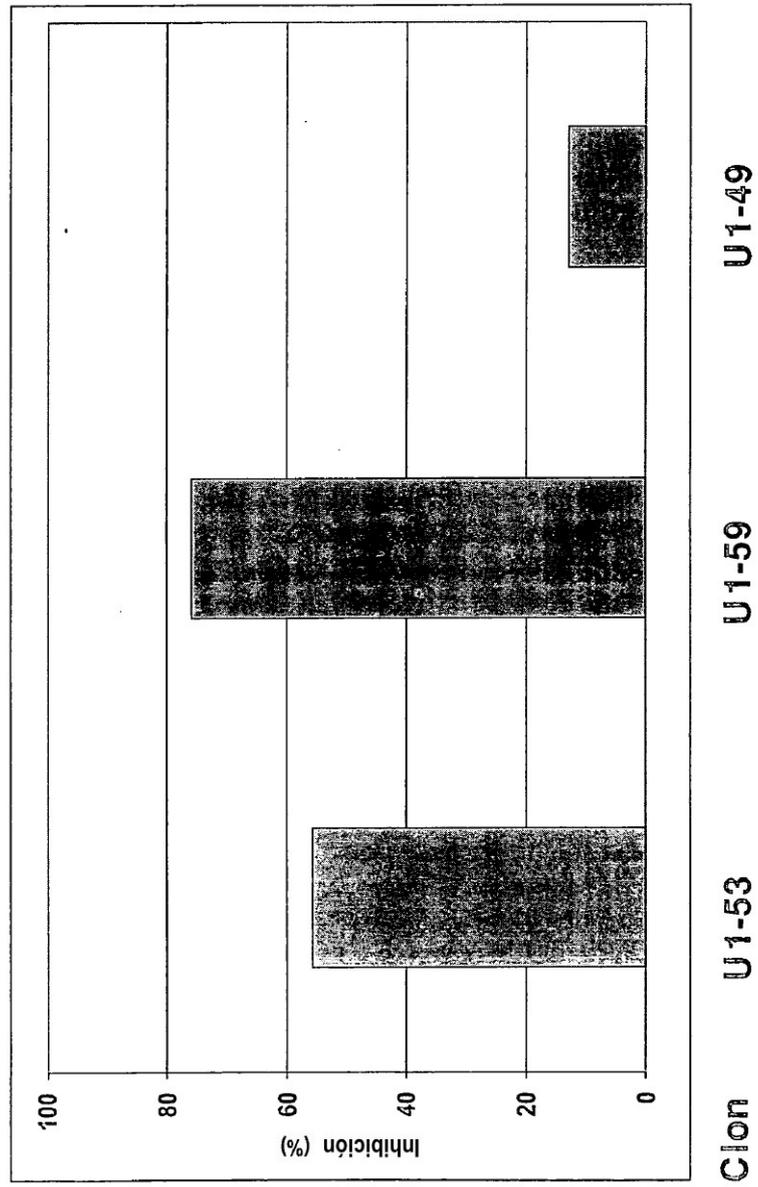
**Fig. 7b** fosforilación de tirosina HER3

Inhibición de la fosforilación de HER3 inducida por  $\beta$ -HRG mediante el anticuerpo anti-HER3 purificado (clon U1-53)

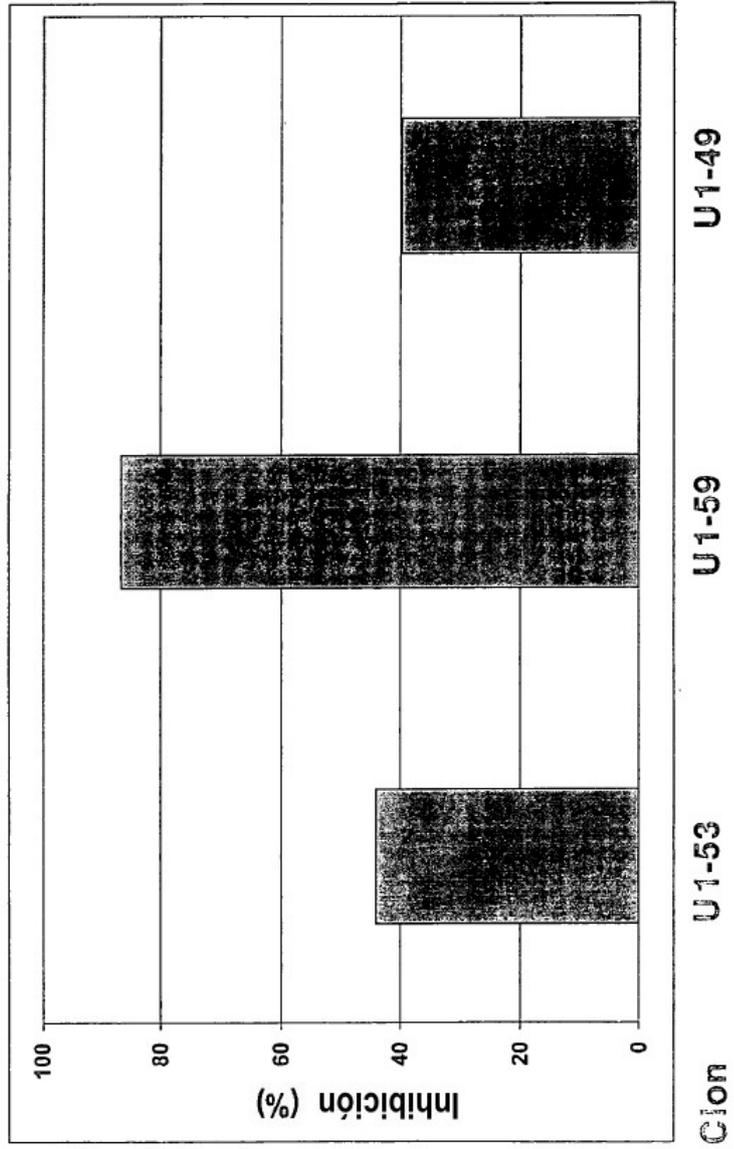


EC50 | 0.1353

**Fig. 8** MAP cinasa



**Fig. 9**  
AKT



**Fig. 10** proliferación

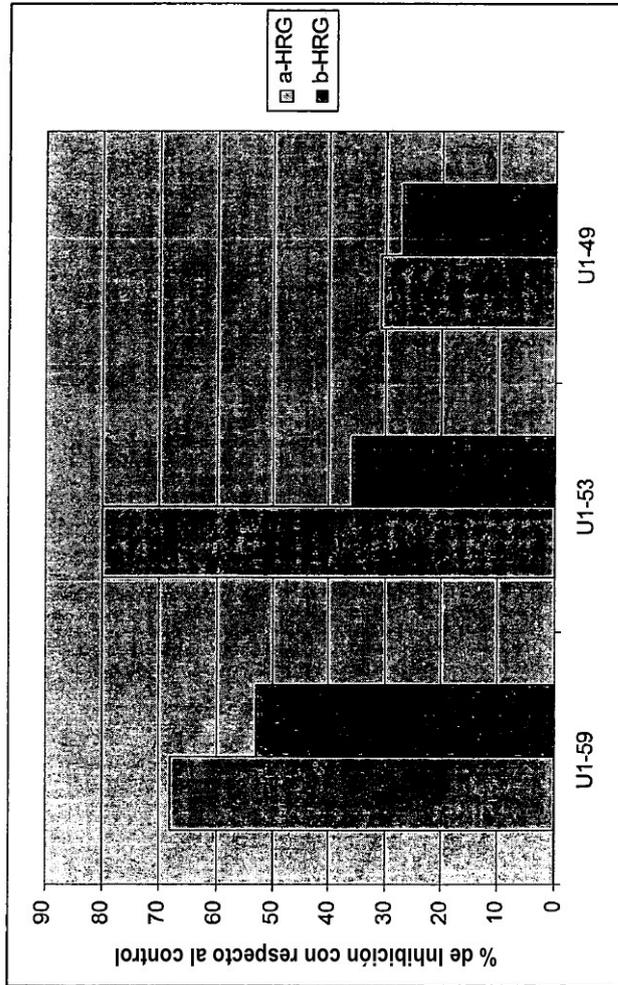
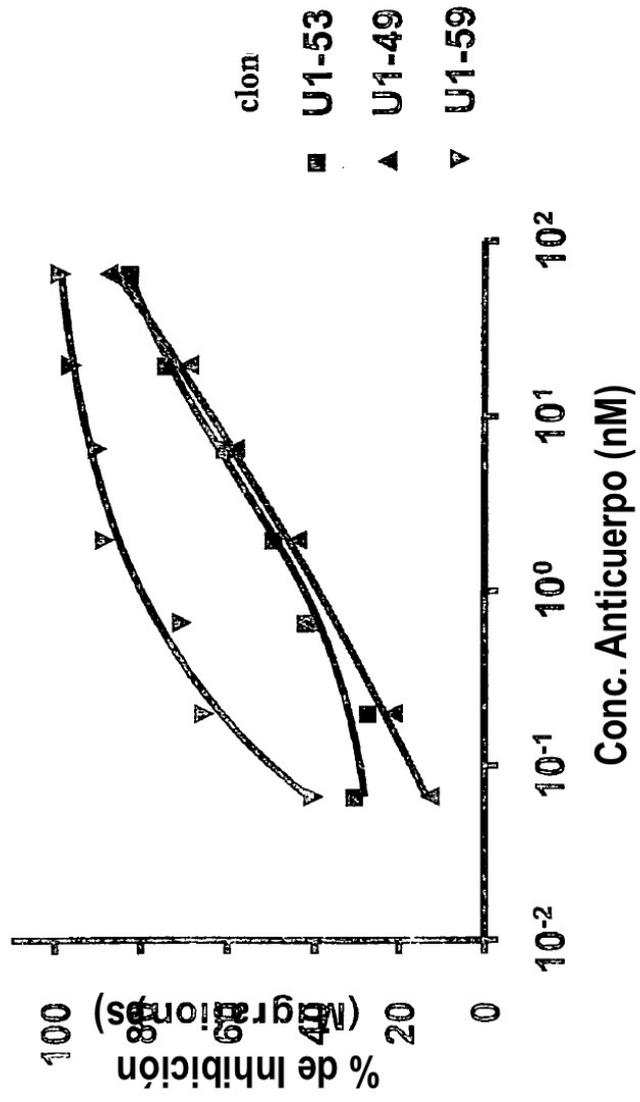
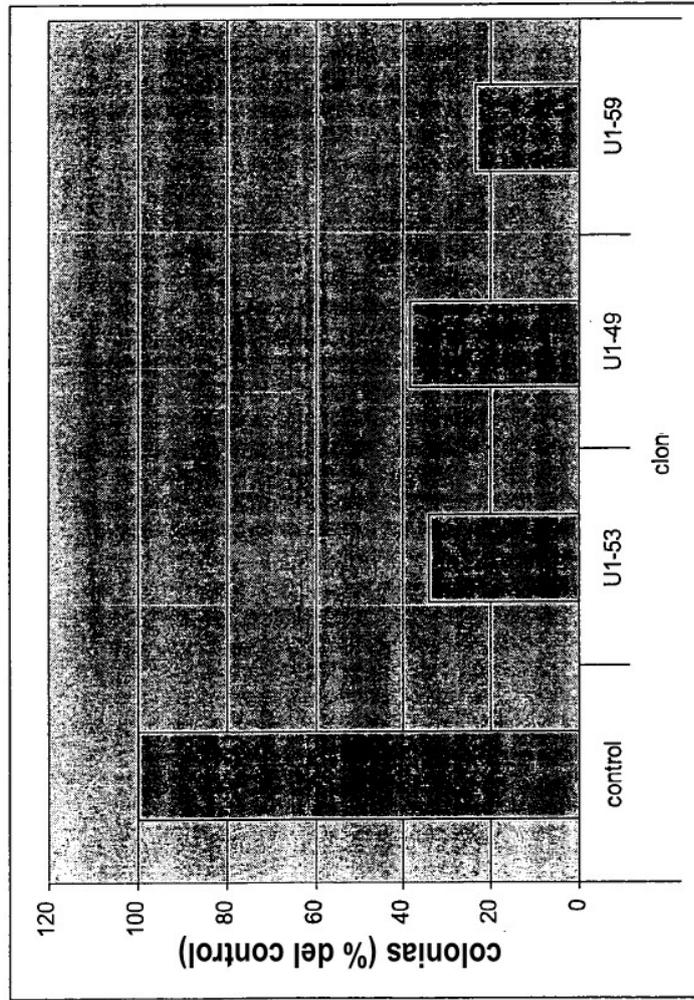


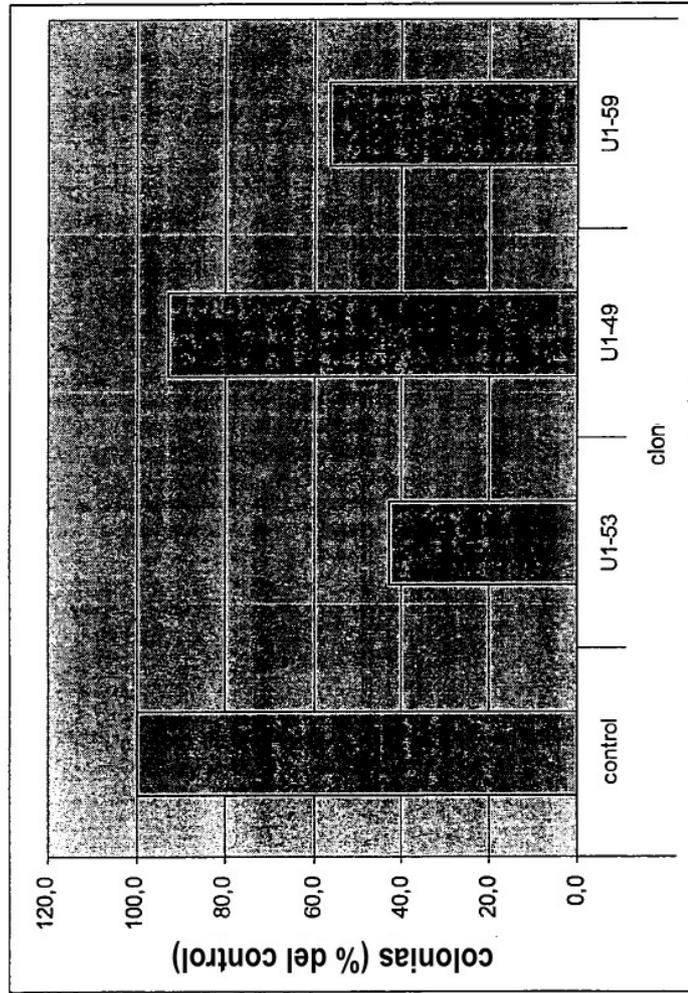
Fig. 11 migración



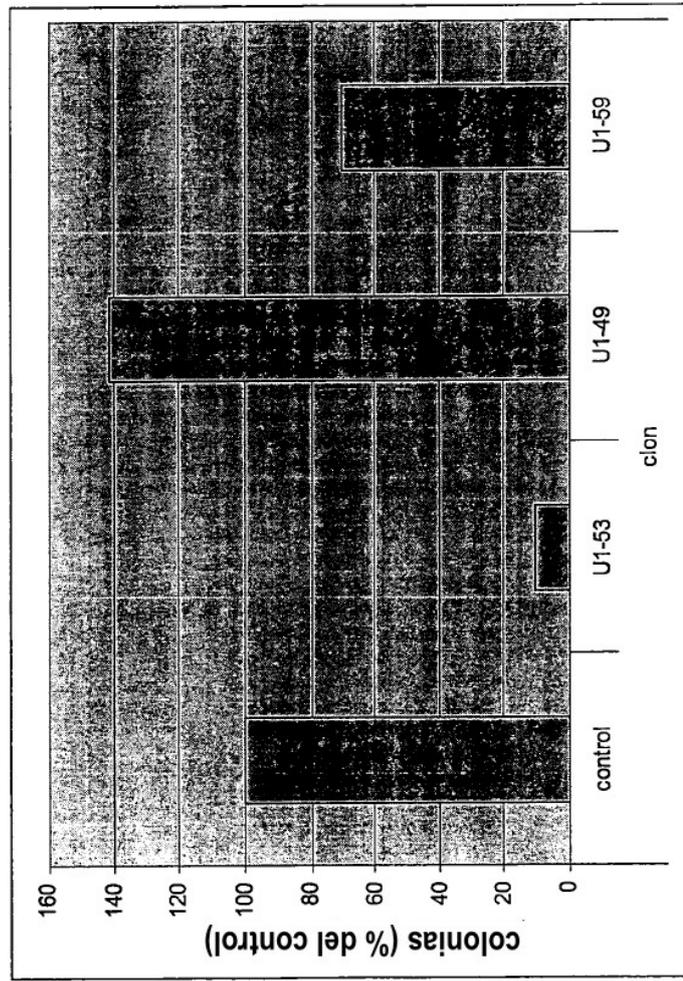
**Fig. 12a**  
MB361 Agar Blando



**Fig. 12b**  
NCI Agar Blando



**Fig. 12c**  
MKN-28 Agar Blando



**Fig. 12d**  
HT-144 Agar Blando

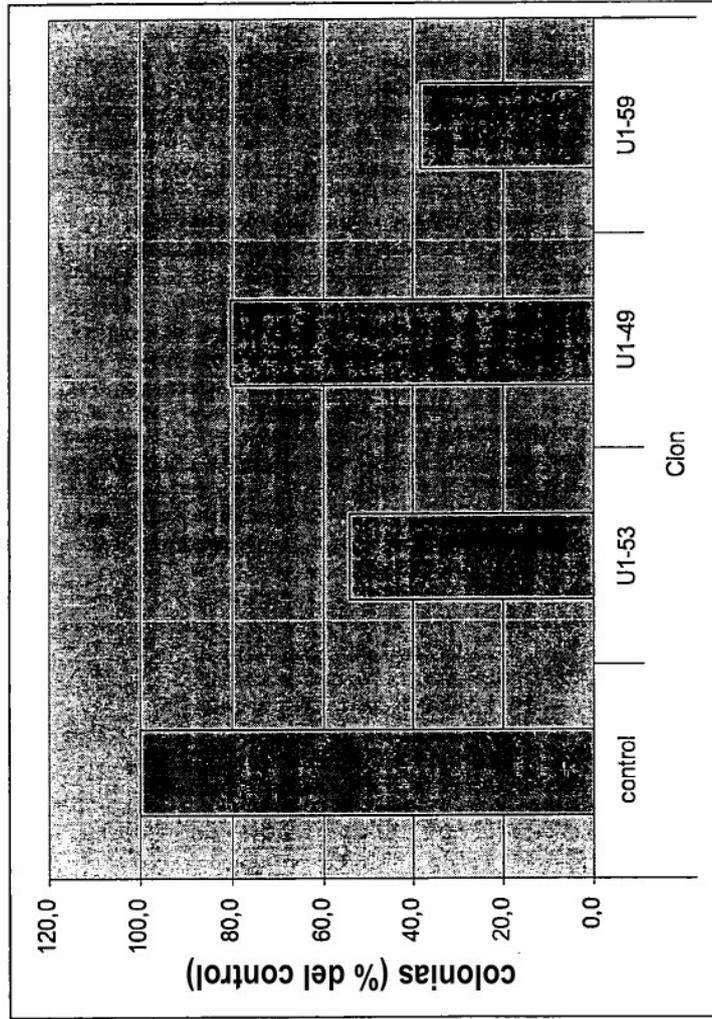
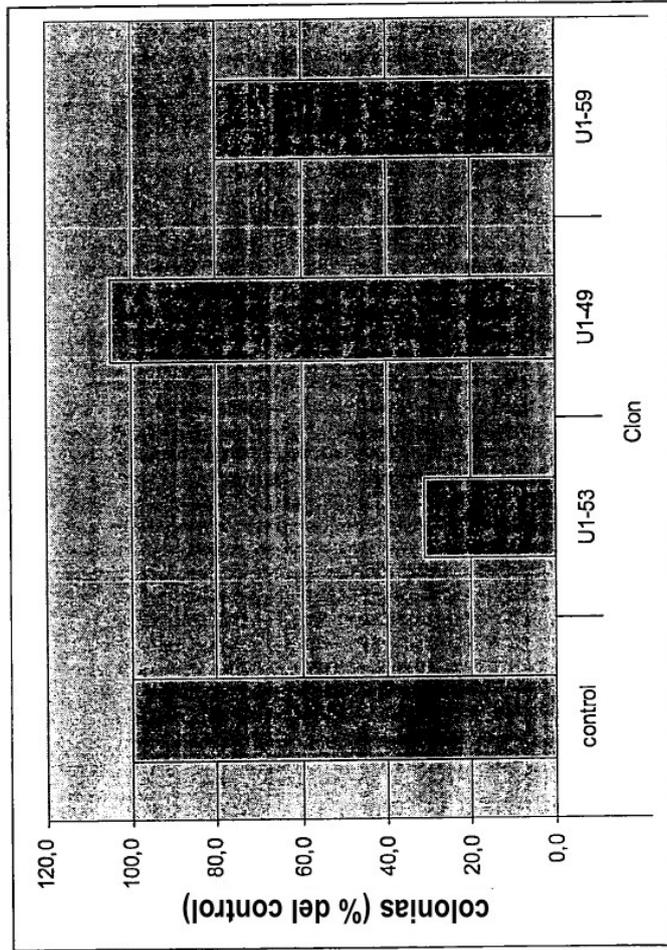
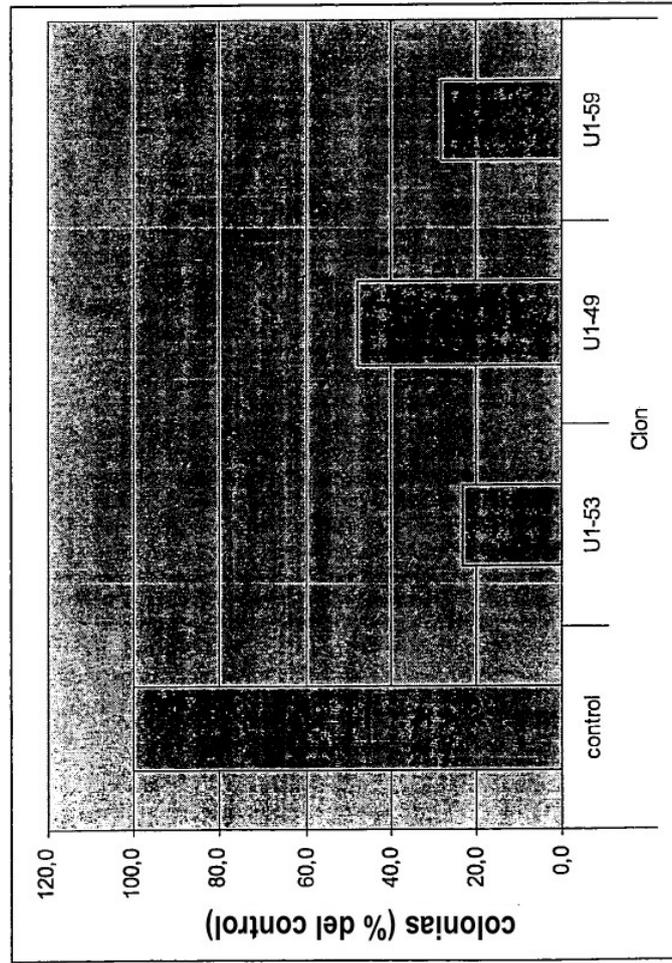


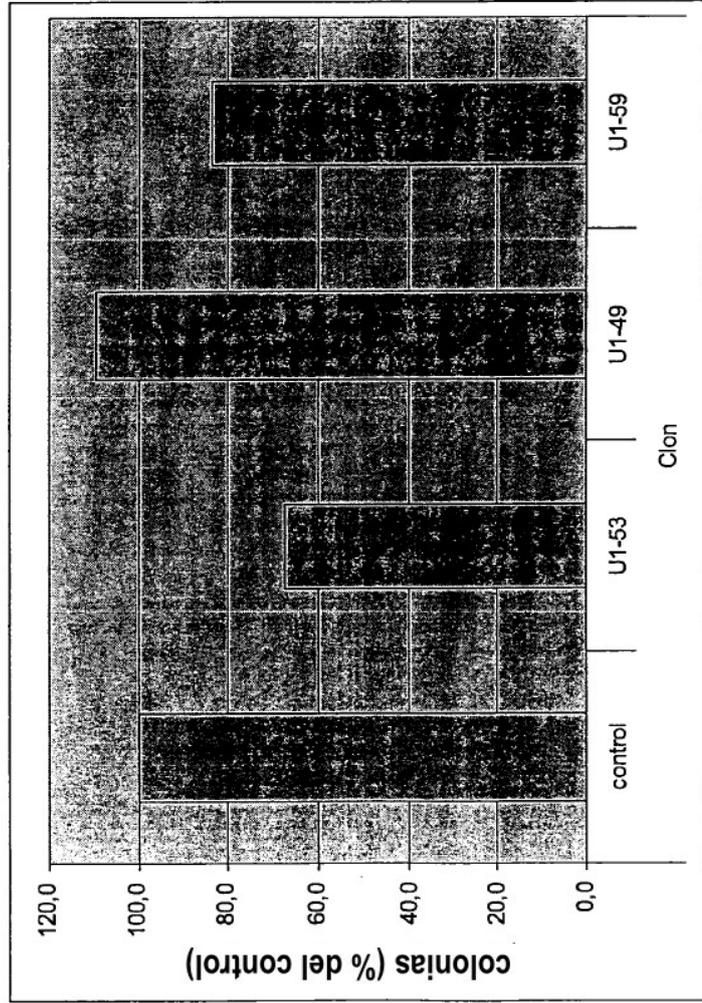
Fig. 12e  
Skov-3 Agar Blando



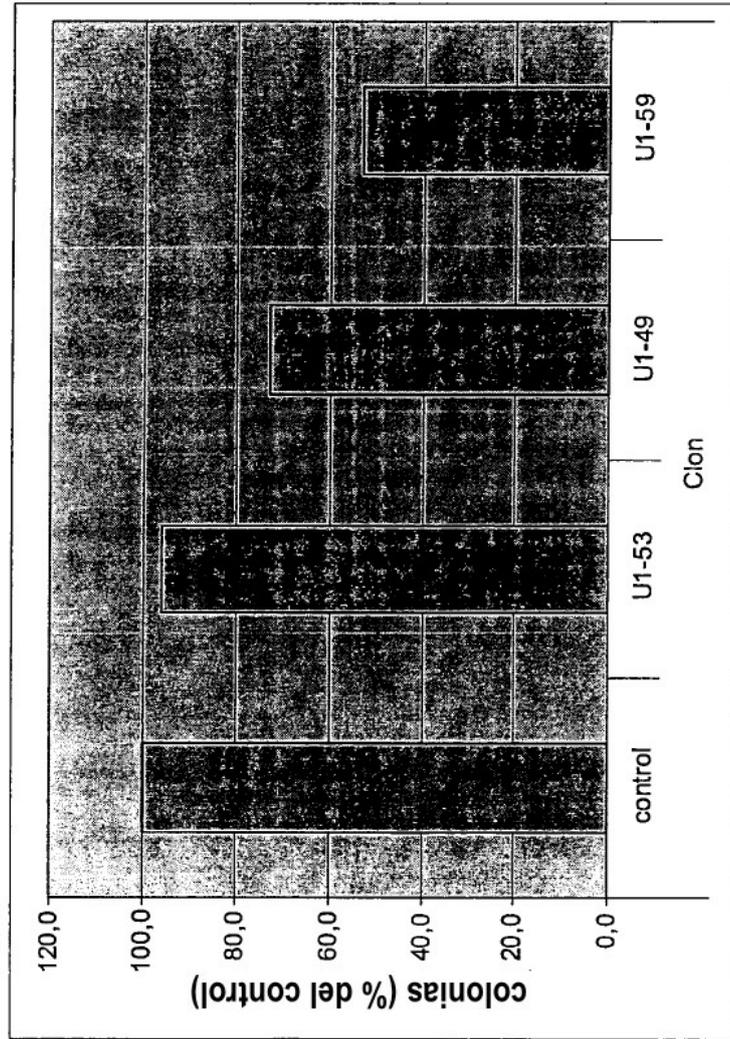
**Fig. 12f** · PPCI Agar Blando



**Fig. 12g**  
BX-PC3 Agar Blando



**Fig. 12h**  
A549 Agar Blando



**Fig. 12i**  
epidermoide Agar Blando

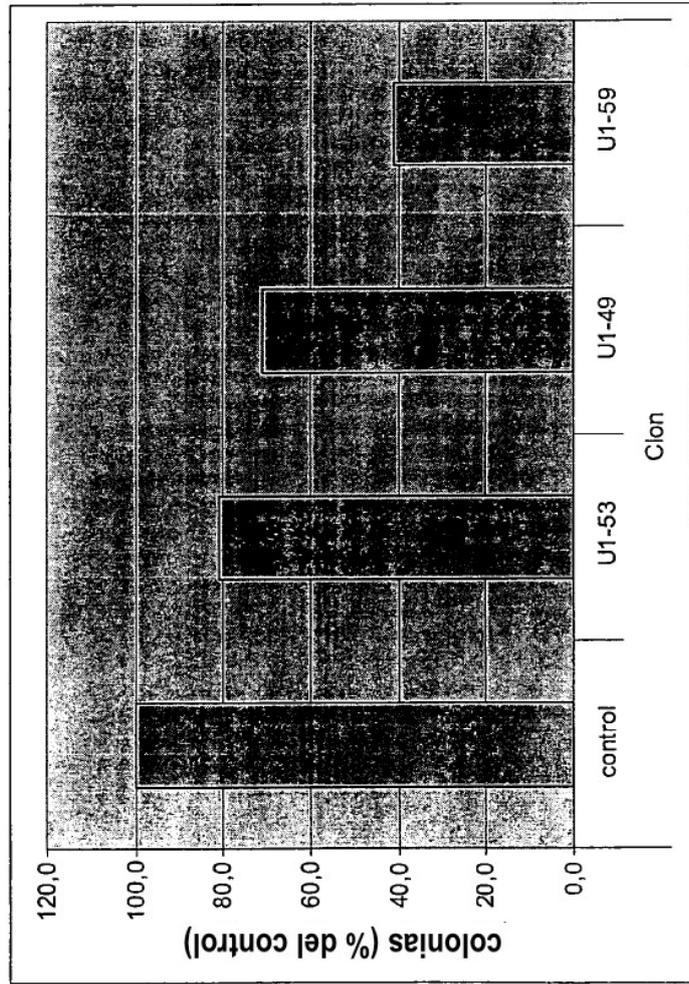
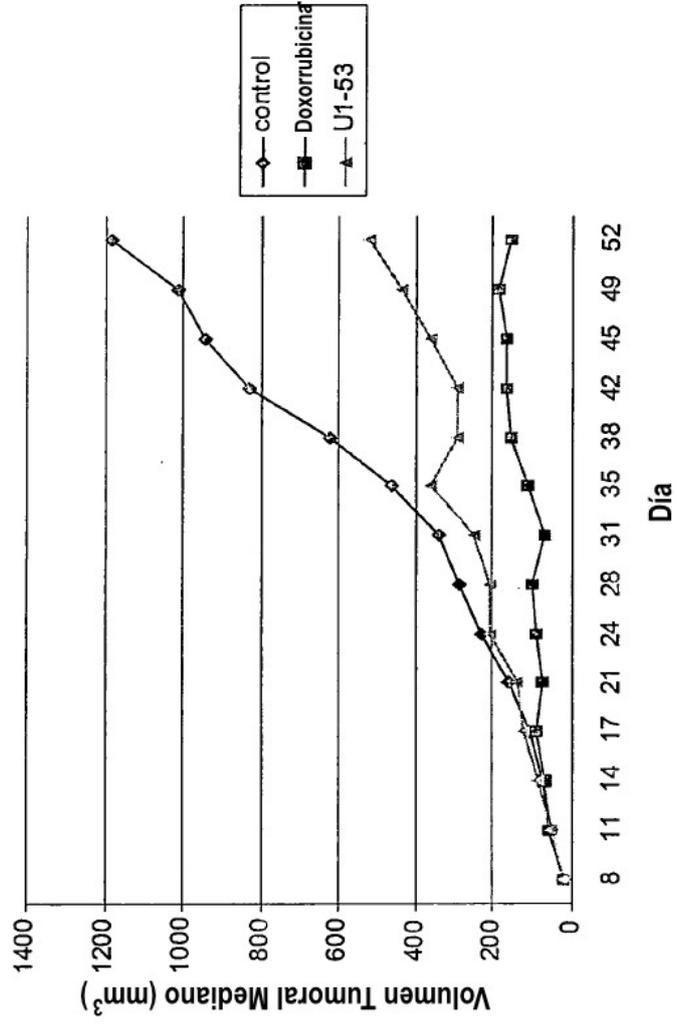
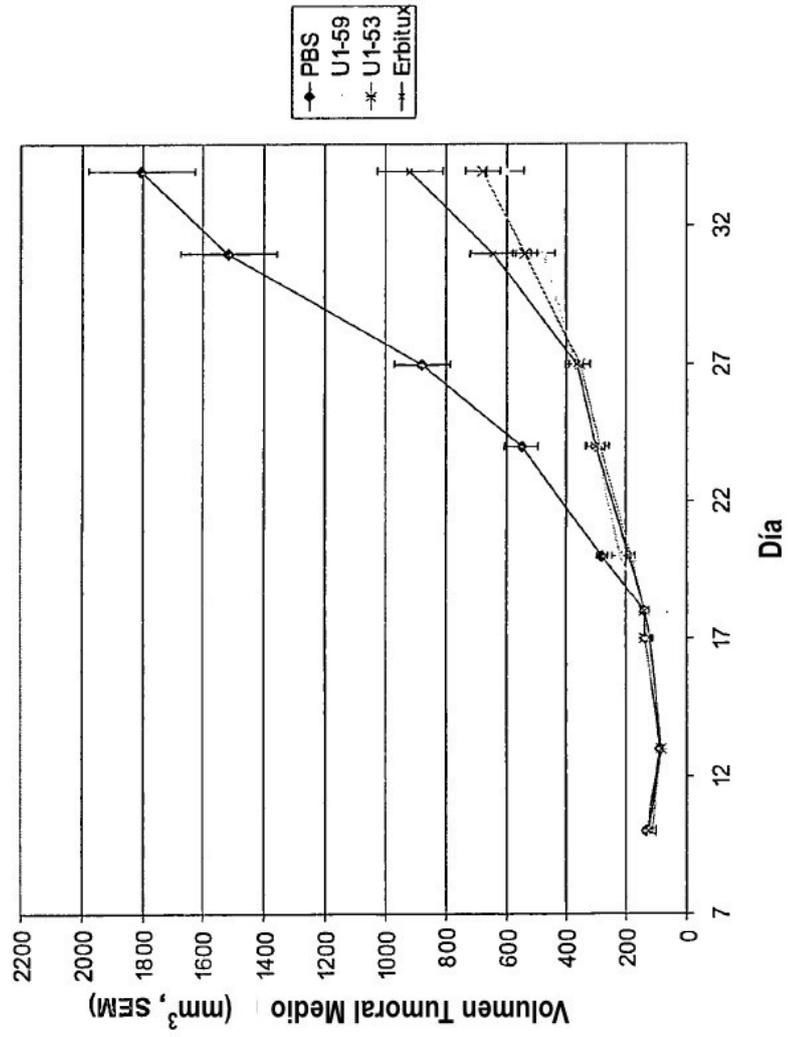


Fig. 13  
T47D in vivo



**Fig. 14** BxPC3



**Fig. 15** Combinación de BxPC3

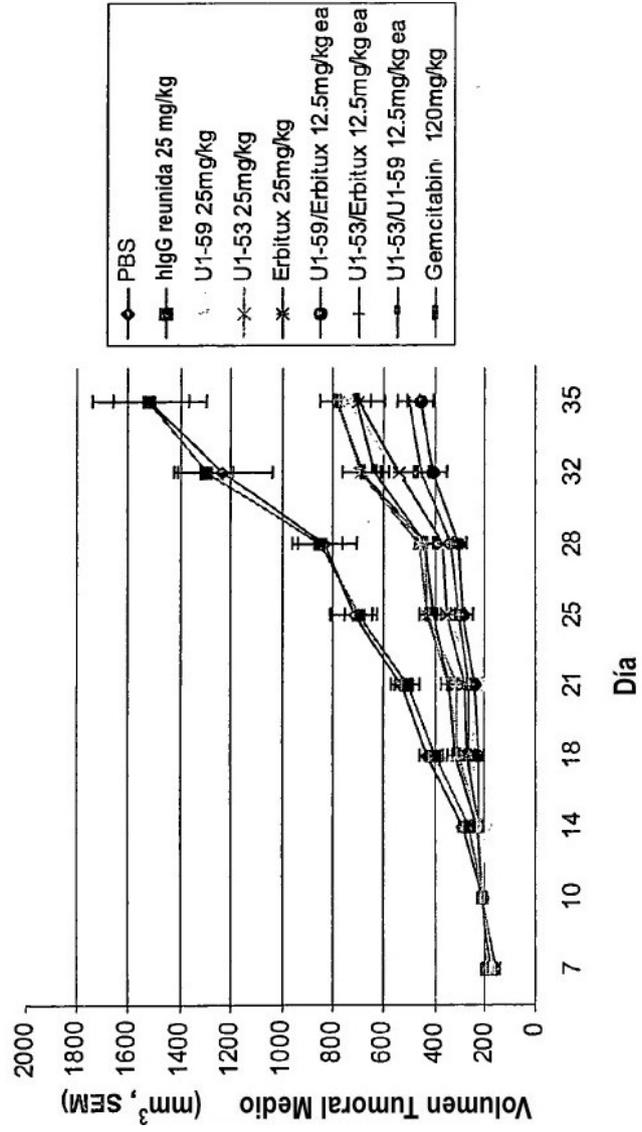


Fig. 16<sub>HT144</sub>

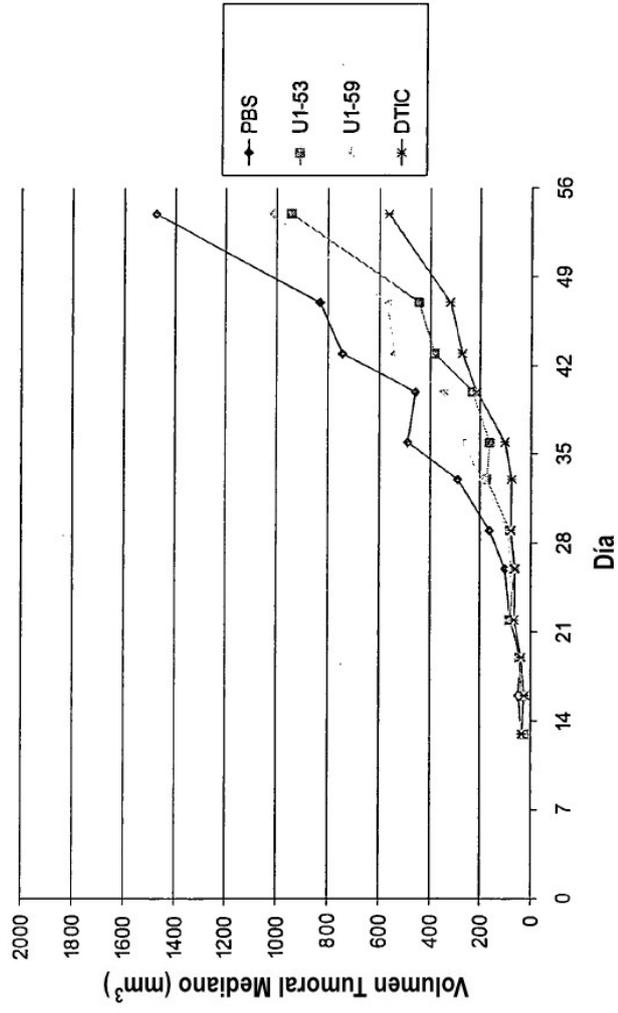


Fig. 17

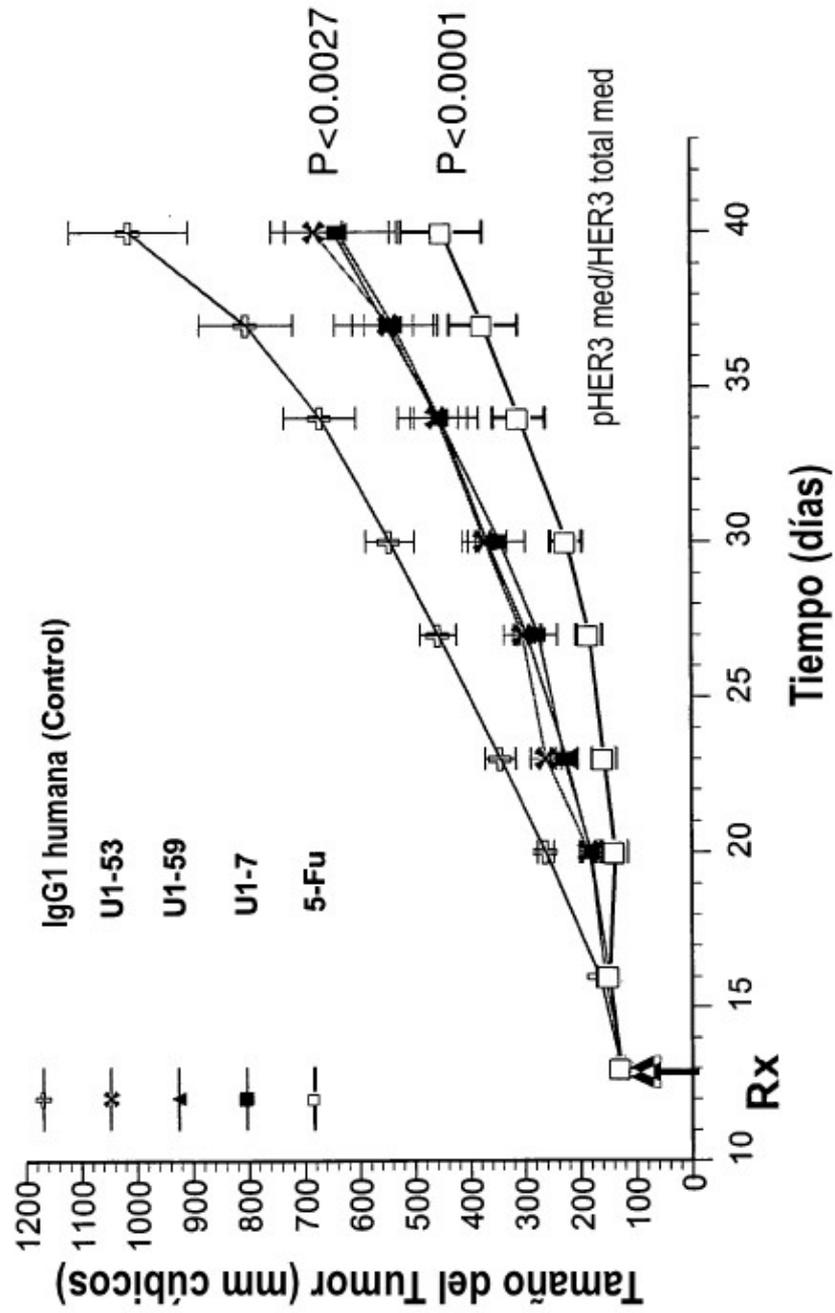


Fig. 18

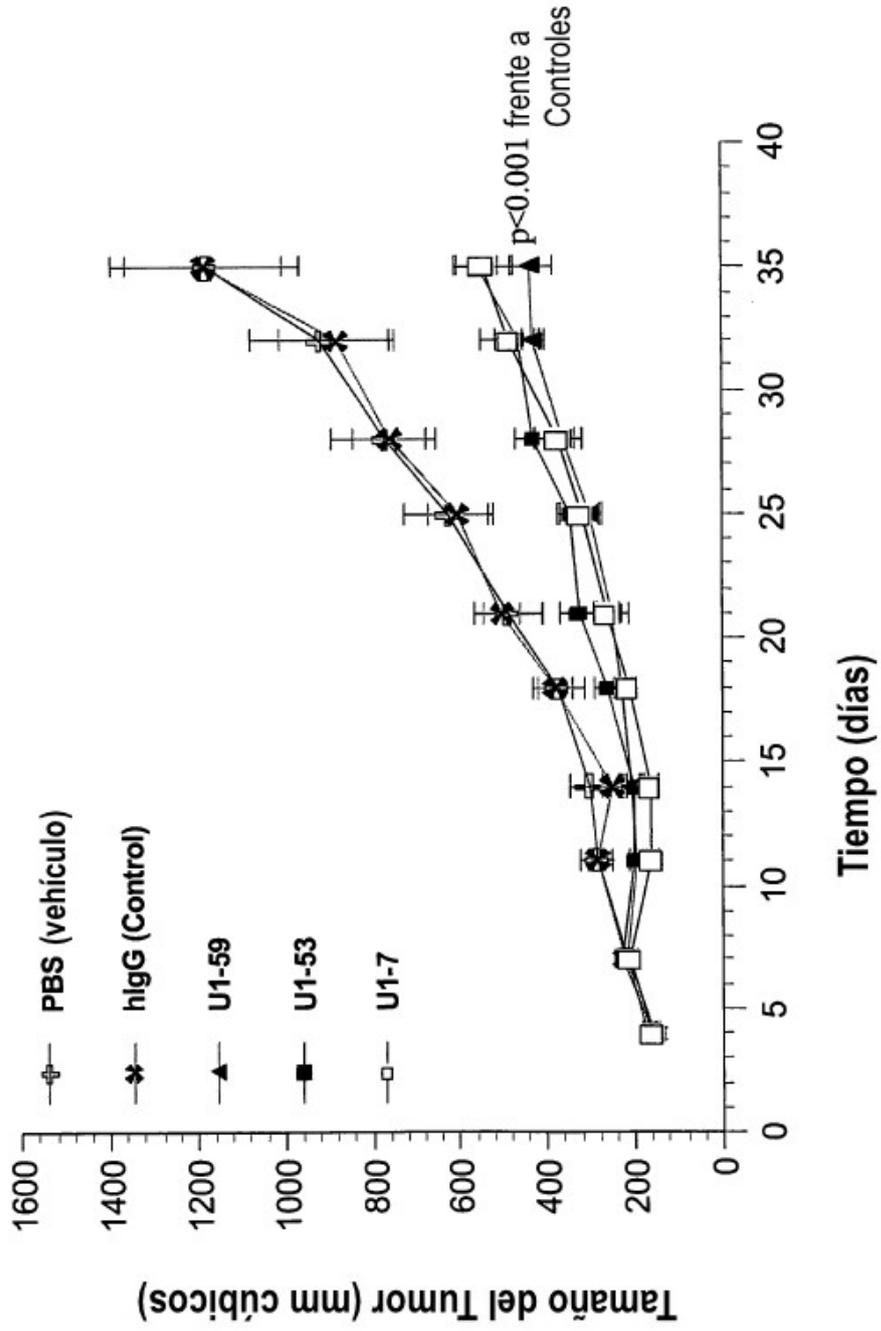


Fig. 19

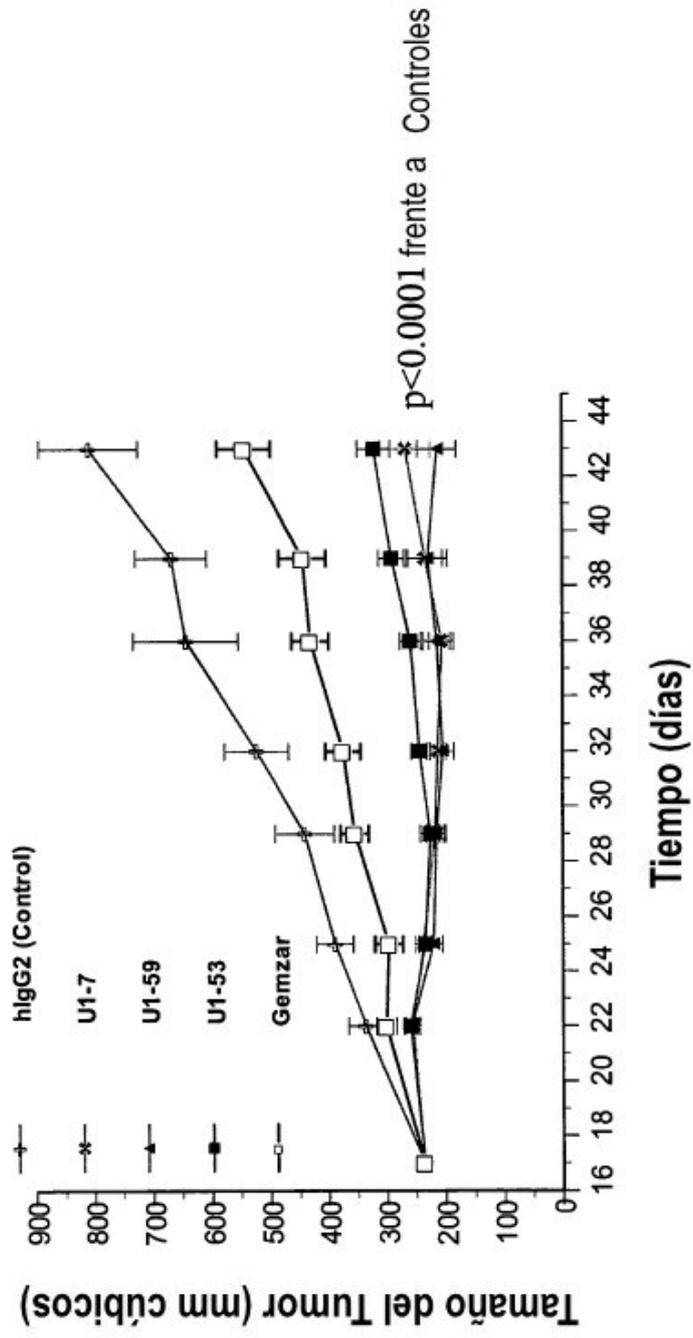


Fig. 20

