

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 962**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2013 PCT/KR2013/003635**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13168918**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2013 E 13788202 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2847227**

54 Título: **Variantes de anticuerpo anti-ErbB2**

30 Prioridad:

08.05.2012 KR 20120048805

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2017

73 Titular/es:

**CHONG KUN DANG PHARMACEUTICAL CORP.
(100.0%)
(Chungjeongno 3-ga, Chong Kun Dang Building)
8, Chungjeong-ro, Seodaemun-gu
Seoul 120-726, KR**

72 Inventor/es:

**MOON, SEUNG-KEE;
PARK, SO-RA y
AN, KI-YOUNG**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 647 962 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

Variantes de anticuerpo anti-ErbB2

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud es una fase nacional de solicitud internacional presentada el 26 de abril de 2013, que reivindica el beneficio de la solicitud de patente coreana n.º 2012-0048805, presentada el 8 de mayo de 2012.

10 **Antecedentes de la invención**Campo de la invención

La presente invención se refiere a variantes de anticuerpo anti-ErbB2 o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, a moléculas de ácido nucleico que codifican para las mismas y a sus usos.

Descripción de la técnica relacionada

Se ha notificado que HER2 (ErbB2), que es un miembro de las tirosina cinasas receptoras tales como EGFR (ErbB1), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4), se ubica en una membrana celular y desempeña un papel importante en el crecimiento, diferenciación y supervivencia celulares (Jaclyn *et al.* Clin Breast Cancer. 8:38-49 (2008)). También se ha notificado que, al contrario que otras proteínas de la familia de HER, HER2 no se activa dependiendo de un ligando, y que se expresan aproximadamente 20.000 HER2 en una membrana celular de células normales mientras que se expresan aproximadamente 20.000.000 HER2 en una membrana celular de células cancerosas (Shepard *et al.* J Clin Immunol. 11:117-127(1991)). Esta sobreexpresión de HER2 induce muchos heterodímeros entre HER2 y HER1, o HER2 y HER3 así como homodímeros HER2-HER2, induciendo así la proliferación y crecimiento celular, dando como resultado una aceleración de la transformación en células cancerosas (Mayumi *et al.* Clin Cancer Res. 12:7242-7251(2006)).

Hasta ahora, la sobreexpresión de HER2 se ha detectado en diversos cánceres tales como cáncer de mama (25-30%), cáncer de ovarios (15-30%), cáncer gástrico (23%), cáncer de pulmón (11-32%), carcinoma de células renales (30-40%), cáncer rectal (17-90%), cáncer pancreático (26-45%), cáncer de vejiga (44%), cáncer de próstata (12%) y cáncer de cabeza y cuello (29-39%) (Cancer Immunol Immunother 53:166-175(2004); Clin Cancer Res 12:4377s-4383s(2006); Br J Cancer 91:1195-1199(2004); Cancer 94:2584-2589(2002); Cancer 98: 66-73(2003); Int J Oncol 27: 681-685(2005); Int J Pancreatol 17:15-21(1995); Int J Cancer 87:349-359 (2000); Ann Oncol 12:S15-S19(2001); J Pathol 204:317-325(2004)). Además, se observó la sobreexpresión de HER2 en cáncer endometrial, tumor de la glándula salivar, cáncer de colon y cáncer de tiroides (Science 229:974(1985); Lancet. 1:765-767(1986); Mol Cell Biol. 6:955-958(1986); Oncogene Res. 3:21-31(1988); Oncogene 4:81-88(1989); Cancer Res. 51:1034(1991); Gynecol. Oncol. 38:364(1990); Cancer Res. 50:421-425(1990); Cancer Res. 50:5184(1990); Cancer Res. 49:6605(1989); Mol. Carcinog. 3:254-257(1990); Br. J. Cancer 57:358-363(1988); Pathobiology 59:46-52(1991); Cancer 65:88-92(1990)).

Herceptin (trastuzumab, 4D5) que es un fármaco anticancerígeno individual dirigido a HER2 recibió aprobación de comercialización en 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico o cáncer de mama temprano cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2, y se administra al paciente en combinación con los otros fármacos anticancerígenos (J. Clin. Oncol. 17:2639-2264(1999)). Herceptin inhibe la supervivencia y proliferación de células cancerosas al inhibir la formación de homodímero HER2-HER2 (Ann Oncol 18:977-984(2007)).

Sin embargo, aunque Herceptin fue satisfactorio como fármaco anticancerígeno dirigido a HER2, simplemente mostró un efecto de respuesta del 12-34% cuando se administró de manera individual y un efecto de respuesta del 38-50% cuando se administró conjuntamente. Además, cuando se administró Herceptin a pacientes de manera individual o en combinación con los otros fármacos, se desarrollaron cardiopatías anómalas en el 2-7% o el 11-28% de los pacientes, y una mujer de cada diez mujeres no pudo recibir la administración de Herceptin debido al riesgo de desarrollar cardiopatías (N Engl J Med 357:39-51(2007)). Por tanto, hay una fuerte demanda de un anticuerpo cuyos efectos secundarios sean menores que con Herceptin, y por tanto Omnitarg (Genetech) está sometiéndose a ensayo clínico de fase III (Clin Cancer Res 12:4436s-4440s(2006)). Sin embargo, Omnitarg tiene un problema con una eficacia inferior en comparación con Herceptin. Por consiguiente, se requiere desarrollar un anticuerpo anti-HER2 novedoso o forma mejorada del mismo, por ejemplo variantes de 4D5 que tengan una afinidad, eficacia o similares mejorados.

Generalmente, es difícil preparar un anticuerpo con alta afinidad por antígeno ya que la superficie expuesta del antígeno es limitada. Especialmente, cuando se realiza la selección *in vitro* a partir de una biblioteca de presentación en fago sin tratar, este fenómeno se produce más. Por consiguiente, la afinidad de anticuerpos preparados a partir de la biblioteca de presentación en fago sin tratar es simplemente de 10-100 nM (Iwai *et al.* Protein Eng Des Sel. 23:185-193(2010)).

Las estrategias para potenciar la afinidad de anticuerpos se dividen en un enfoque aleatorio y un enfoque dirigido (Sheedy *et al.* Biotechnol Adv. 5(4):333-52(2007)). El enfoque dirigido se refiere a una estrategia para introducir algunas mutaciones en aminoácidos específicos, por ejemplo, CDR o FR, en la que se usan PCR dirigida, paseo de CDR, mutagénesis dirigida al sitio y punto caliente de diana de CDR. El enfoque aleatorio se refiere a una estrategia para introducir modificaciones en dominios variables, en la que se usa PCR propensa a errores, intercambio de ADN e intercambio de cadena (Kim *et al.* AdvDrug DelivRev. 58:657-667(2006)). Se construyen diversas variantes preparadas mediante los métodos mencionados anteriormente como bibliotecas, seguido por presentación de las diversas bibliotecas de variantes sobre la superficie de fagos, y después se seleccionan variantes mejoradas. Además, para la presentación también se usan la presentación en levaduras y la presentación en ribosomas (Rader *et al.* Curr Opin Biotechnol. 8:503-508(1997); Zahnd *et al.* J Biol Chem. 279(18):18870-18877(2004)).

La solicitud de patente US 2011/159014 da a conocer variantes de Herceptin con sustituciones en las cadenas variables. En la misma también se proporcionan mutantes dobles en la V_H. Las solicitudes internacionales WO 2011/084496, WO 2005/092925 y WO 2007/127506 y Gerstner *et al.* 2002 (J. Mol. Biol., vol. 321, páginas 851-862) también dan a conocer variantes de trastuzumab.

A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a diversas patentes y publicaciones y se proporcionan citas entre paréntesis con el fin de describir más completamente esta invención y el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han realizado intensas investigaciones para desarrollar variantes de anticuerpo que tengan una afinidad y actividad inhibidora de células cancerosas más mejoradas que el anticuerpo humanizado anti-ErbB2 4D5. Como resultado, se han preparado variantes de anticuerpo anti-ErbB2 que pueden mostrar no sólo una afinidad superior sino también una actividad inhibidora de células cancerosas superior a las del anticuerpo original.

Por consiguiente, un objetivo de esta invención es proporcionar una variante de anticuerpo anti-ErbB2 o fragmento de unión a antígeno de la misma tal como se define en las reivindicaciones adjuntas 1-3.

Un objetivo adicional de esta invención es proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifica para la variante de anticuerpo anti-ErbB2 o fragmento de unión a antígeno de la misma.

Todavía otro objetivo de esta invención es proporcionar una composición farmacéutica para prevenir o tratar un cáncer.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con las reivindicaciones y los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa esquemáticamente partes de un vector que expresa transcritos para la presentación de scFv. Un marco de lectura abierto codifica para la secuencia de señal de OmpA, un dominio variable de cadena ligera (V_L), una secuencia de ligador (L), un dominio variable de cadena pesada (V_H), una secuencia de etiqueta de c-myc y una proteína de la cápsida viral.

La figura 2 representa resultados de ELISA monoclonal para seleccionar clones de *E. coli* que producen scFv-pIII que se une a ErbB2.

La figura 3 representa resultados de comparación de secuencias de aminoácidos entre V_H del anticuerpo humanizado 4D5 (SEQ ID NO: 1), V_H de AH06 y A058 (cada SEQ ID NO: 3), V_H de AH16 (SEQ ID NO: 4), y V_H de A091 (SEQ ID NO: 6).

La figura 4 representa los resultados de comparación de secuencias de aminoácidos entre V_L del anticuerpo humanizado 4D5, AH06 y AH16 (cada SEQ ID NO: 2), V_L de A05 (SEQ ID NO: 5), y V_L de A091 (SEQ ID NO: 7).

La figura 5 representa resultados de SDS-PAGE de las variantes de anticuerpo anti-ErbB2 de la presente invención que corresponden a anticuerpos A091, A058 y AH06, tal como se preparan y se purifican a partir de una célula animal.

Las figuras 6-8 representan resultados de análisis para determinar los efectos inhibidores de la variante de anticuerpo anti-ErbB2 sobre la proliferación celular. Figura 6: D98W, figura 7: A058 y A091, figura 8: AH06 y AH16. Se evaluó IgG purificada en células NCI-N87 durante 6 días.

Descripción detallada de esta invención

La presente invención da a conocer una variante de anticuerpo anti-ErbB2 o fragmento de unión a antígeno de la misma, que comprende: (a) un dominio variable de cadena ligera; y (b) un dominio variable de cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos tiene al menos dos sustituciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en: una sustitución de Pro en la posición 41 por Arg, una sustitución de Gly en la posición 96 por Asn, una sustitución de Gly en la posición 97 por Ala, una sustitución de Asp en la posición 98 por Trp, una sustitución de Asp en la posición 98 por Lys, una sustitución de Ala en la posición 100b por Ser, una sustitución de Met en la posición 100c por Phe, una sustitución de Asp en la posición 101 por Ala, una sustitución de Asp en la posición 101 por Val, una sustitución de Tyr en la posición 102 por His, y una sustitución de Tyr en la posición 102 por Leu, en la que las posiciones son indicativas de posiciones en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y se numeran según el sistema de numeración de Kabat.

Los presentes inventores han realizado intensas investigaciones para desarrollar variantes de anticuerpo que tienen una afinidad y actividad inhibidora de células cancerosas más mejoradas que el anticuerpo humanizado anti-ErbB2 4D5. Como resultado, se han preparado variantes de anticuerpo anti-ErbB2 que pueden mostrar no sólo una afinidad superior sino también una actividad inhibidora de células cancerosas superior a las del anticuerpo original.

A continuación en el presente documento se describirá la presente invención en más detalle.

I. Variantes de anticuerpo anti-ErbB2 y fragmento de unión a antígeno de las mismas

Las variantes de anticuerpo de esta invención tienen una afinidad de unión específica a ErbB2.

El término "variante de anticuerpo" usado en el presente documento se refiere a una variante con sustituciones de aminoácido que tiene dominios variables que tienen sustituciones en al menos dos aminoácidos en el dominio variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo 4D5. La presente invención proporciona variantes de anticuerpo que tienen una afinidad y actividad inhibidora de la proliferación de células cancerosas mejoradas mediante sustituciones de aminoácido en una posición específica del dominio variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo original 4D5.

Tal como se muestra en los ejemplos a continuación, la afinidad de las presentes variantes de anticuerpo por ErbB2 se mejora hasta un máximo de 8 veces en comparación con 4D5 (tabla 5), y la actividad inhibidora de las presentes variantes de anticuerpo frente a la proliferación de células de cáncer gástrico es aproximadamente 3,5 veces superior a la de 4D5 (figura 8).

El dominio variable de cadena pesada de 4D5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y el dominio variable de cadena ligera de 4D5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Se pretende que anticuerpo incluya todo el anticuerpo así como cualquier fragmento de anticuerpo.

Todo el anticuerpo incluye dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa, y cada cadena ligera está unida a la cadena pesada mediante un enlace disulfuro. La región constante de cadena pesada incluye cinco isotipos diferentes (γ , μ , α , δ y ϵ) cuyas subclases se clasifican en $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, $\alpha 1$ y $\alpha 2$. La región constante de cadena ligera incluye dos isotipos diferentes (κ y λ).

Fragmento de unión a antígeno se refiere a cualquier fragmento de anticuerpo que puede unirse a antígeno incluyendo Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv y así sucesivamente. Fab tiene un sitio de unión a antígeno que está compuesto por un dominio variable de cada una de la cadena pesada y ligera del anticuerpo, una región constante de cadena ligera y la primera región constante (C_{H1}) de cadena pesada. Fab' es diferente de Fab en el sentido de que hay una región de bisagra que contiene uno o más residuos de cisteína en el sentido C-terminal del dominio C_{H1} de cadena pesada. El anticuerpo F(ab')₂ se produce formando un enlace disulfuro entre residuos de cisteína de la región de bisagra de Fab'. Fv es un fragmento de anticuerpo mínimo que incluye una región variable cada una de la cadena pesada y ligera y se da a conocer una técnica recombinante para preparar un fragmento Fv en los documentos PCT WO 88/01649, WO 88/06630, WO 88/07085, WO 88/07086 y WO 88/09344. El Fv bicatenario se une mediante enlace no covalente entre una región variable de cada una de la cadena pesada y ligera, y el Fv monocatenario se une generalmente mediante enlace covalente a través de un ligador peptídico entre una región variable de cada una de la cadena pesada y ligera o se une directamente entre sí en sentido C-terminal, formando un dímero tal como Fv bicatenario. Tales fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse usando enzimas proteolíticas (por ejemplo, se digiere un anticuerpo completo con papaína para producir fragmentos Fab, y el tratamiento con pepsina da como resultado la producción de fragmentos F(ab')₂), y pueden prepararse mediante técnicas de recombinación genética.

Según una realización, el anticuerpo de esta invención es una forma de Fv o un anticuerpo entero. Además, la región constante de cadena pesada se selecciona de los isotipos que consisten en γ , μ , α , δ o ϵ . Preferiblemente, la región constante de cadena pesada incluye el isotipo $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 3$ (IgG3) y $\gamma 4$ (IgG4). La región constante de cadena ligera incluye el isotipo κ y λ .

El término “cadena pesada” usado en el presente documento se refiere tanto a una cadena pesada de longitud completa como a una parte de la misma, que incluye dominio variable (V_H) que contiene la secuencia de aminoácidos con una secuencia de región variable para unirse específicamente a antígeno y tres dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}). El término “cadena ligera” usado en el presente documento se refiere tanto a una

5 cadena ligera de longitud completa como a una parte de la misma, que incluye dominio variable (V_L) que contiene la secuencia de aminoácidos con una secuencia de región variable para unirse específicamente a antígeno y tres dominios constantes (C_L).

10 Según una realización, el dominio variable de cadena pesada comprende las siguientes sustituciones de aminoácido:

(i) una sustitución de Asp en la posición 98 por Trp, una sustitución de Met en la posición 100c por Phe, una sustitución de Asp en la posición 101 por Ala, y una sustitución de Tyr en la posición 102 por Leu (SEQ ID NO: 3), que es el caso de los anticuerpos AH06 y A058;

15 (ii) una sustitución de Gly en la posición 96 por Asn, una sustitución de Gly en la posición 97 por Ala, una sustitución de Asp en la posición 98 por Lys, una sustitución de Ala en la posición 100b por Ser, una sustitución de Met en la posición 100c por Phe, una sustitución de Asp en la posición 101 por Val, y una sustitución de Tyr en la posición 102 por His (SEQ ID NO: 4), que no se encuentra dentro del alcance de la presente invención; o

20 (iii) una sustitución de Pro en la posición 41 por Arg, una sustitución de Asp en la posición 98 por Trp, una sustitución de Met en la posición 100c por Phe, una sustitución de Asp en la posición 101 por Ala, y una sustitución de Tyr en la posición 102 por Leu (SEQ ID NO: 6), que es el caso del anticuerpo A091.

25 Las posiciones son indicativas de posiciones en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y se numeran según el sistema de numeración de Kabat. Específicamente, la posición 41 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 41 de SEQ ID NO: 1 (Pro), la posición 96 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 100 de SEQ ID NO: 1 (Gly), la posición 97 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 101 de SEQ ID NO: 1 (Gly), la posición 98 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 102 de SEQ ID NO: 1 (Asp), la posición 100b según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 106 de SEQ ID NO: 1 (Ala), la posición 100c según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 107 de SEQ ID NO: 1 (Met), la posición 101 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 108 de SEQ ID NO: 1 (Asp), y la posición 102 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 109 de SEQ ID NO: 1 (Tyr).

35 Según una realización, el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o al menos dos sustituciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en: una sustitución de Ser en la posición 50 de SEQ ID NO: 2 por Thr, una sustitución de Ala en la posición 51 de SEQ ID NO: 2 por Thr, una sustitución de Ser en la posición 52 de SEQ ID NO: 2 por Thr, una sustitución de Phe en la posición 53 de SEQ ID NO: 2 por Trp, una sustitución de Leu en la posición 54 de SEQ ID NO: 2 por Pro, una sustitución de Thr en la posición 72 de SEQ ID NO: 2 por Ser, una sustitución de His en la posición 91 de SEQ ID NO: 2 por Tyr, una sustitución de Thr en la posición 93 de SEQ ID NO: 2 por Gln, una sustitución de Thr en la posición 93 de SEQ ID NO: 2 por Asn, una sustitución de Pro en la posición 96 de SEQ ID NO: 2 por Ala, una sustitución de Pro en la posición 96 de SEQ ID NO: 2 por Val, y una sustitución de Thr en la posición 97 de SEQ ID NO: 2 por Ser, y en el que las posiciones se numeran según el sistema de numeración de Kabat.

Según una realización, el dominio variable de cadena ligera comprende las siguientes sustituciones de aminoácido:

50 (i) una sustitución de Thr en la posición 93 de SEQ ID NO: 2 por Gln, una sustitución de Pro en la posición 96 de SEQ ID NO: 2 por Ala, y una sustitución de Thr en la posición 97 de SEQ ID NO: 2 por Ser (SEQ ID NO: 5), que es el caso del anticuerpo A058; o

55 (ii) una sustitución de Ser en la posición 50 de SEQ ID NO: 2 por Thr, una sustitución de Ala en la posición 51 de SEQ ID NO: 2 por Thr, una sustitución de Ser en la posición 52 de SEQ ID NO: 2 por Thr, una sustitución de Phe en la posición 53 de SEQ ID NO: 2 por Trp, una sustitución de Leu en la posición 54 de SEQ ID NO: 2 por Pro, una sustitución de Thr en la posición 72 de SEQ ID NO: 2 por Ser, una sustitución de His en la posición 91 de SEQ ID NO: 2 por Tyr, una sustitución de Thr en la posición 93 de SEQ ID NO: 2 por Asn, y una sustitución de Pro en la posición 96 de SEQ ID NO: 2 por Val (SEQ ID NO: 7), que es el caso del anticuerpo A091.

60 La posición 50 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 50 de SEQ ID NO: 2 (Ser), la posición 51 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 51 de SEQ ID NO: 2 (Ala), la posición 52 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 52 de SEQ ID NO: 2 (Ser), la posición 53 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 53 de SEQ ID NO: 2 (Phe), la posición 54 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 54 de SEQ ID NO: 2 (Leu), la posición 72 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 72 de SEQ ID NO: 2 (Thr), la posición 91 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 91 de SEQ ID NO: 2 (His),

la posición 93 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 93 de SEQ ID NO: 2 (Thr), la posición 96 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 96 de SEQ ID NO: 2 (Pro), y la posición 97 según el sistema de numeración de Kabat significa el aminoácido número 97 de SEQ ID NO: 2 (Thr).

5 Según una realización, la presente variante de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma comprende (a) un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6; y (b) un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7.

10 Según una realización, la presente variante de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma comprende los siguientes dominios variables de cadena ligera y pesada:

(i) un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3;

15 (ii) un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3; o

(iii) un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6.

20 El anticuerpo de la presente invención incluye, pero no se limita a, anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico, Fv monocatenarios (scFV), anticuerpo monocatenario, fragmento Fab, fragmento F(ab'), Fv unidos por enlace disulfuro (sdFV) y anticuerpo antiidiotipo (anti-Id), y fragmento de unión a epítipo de los mismos.

25 Según una realización, las variantes de anticuerpo de la presente invención son un anticuerpo humanizado.

El presente anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno incluye análogos de secuencias de aminoácidos expuestas en la lista de secuencias adjunta, que pueden reconocer específicamente HER2. Por ejemplo, la
 30 secuencia de aminoácidos del anticuerpo puede alterarse para mejorar la afinidad de unión y/o las otras características biológicas del anticuerpo, por ejemplo incluyendo las alteraciones preparadas mediante delección, inserción y/o sustitución de residuos de aminoácido del anticuerpo. Tales variaciones de aminoácidos pueden proporcionarse basándose en una similitud relativa de cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo, hidrofobia, hidrofilia, carga y tamaño. Mediante el análisis para determinar el tamaño, la forma y el tipo de las cadenas laterales
 35 de aminoácido, puede quedar claro que todos de los residuos de arginina, lisina e histidina son los que tienen carga positiva; alanina, glicina y serina tienen un tamaño similar; fenilalanina, triptófano y tilosina tienen una forma similar. Por consiguiente, basándose en estos factores considerables, arginina, lisina y histidina; alanina, glicina y serina; y fenilalanina, triptófano y tilosina pueden considerarse equivalentes biológicamente funcionales.

40 Para introducir una mutación, puede considerarse un índice hidropático de aminoácidos. Basándose en la hidrofobia y la carga, se asigna el índice hidropático a cada aminoácido: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tilosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

45 Para proporcionar una función biológica interactiva de proteínas, el índice hidropático del aminoácido es muy importante. Un experto en la técnica sabe bien que variaciones pueden presentar una actividad biológica similar únicamente cuando se sustituyen proteínas por aminoácidos que tienen un índice hidropático similar. Cuando se pretende introducir variaciones basándose en el índice hidropático, la sustitución se realiza preferiblemente entre
 50 residuos de aminoácido que no tienen una diferencia de más de ± 2 en los valores de índice hidropático, más preferiblemente dentro de ± 1 , mucho más preferiblemente dentro de $\pm 0,5$.

También resultará obvio para los expertos en la técnica que sustituciones de aminoácidos por otros aminoácidos que tienen valores de hidrofilia similares pueden dar como resultado la generación de variantes que tienen actividades biológicamente equivalentes. Tal como se da a conocer en la patente estadounidense n.º 4.554.101, a cada residuo de aminoácido se le asignan los siguientes valores de hidrofilia: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato ($\pm 3,0 \pm 1$); glutamato ($\pm 3,0 \pm 1$); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tilosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

60 La alteración de residuos de aminoácido para no alterar sustancialmente la actividad de proteína la conoce bien un experto en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, Nueva York, 1979). Tal alteración de aminoácidos incluye Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, pero no se limita a ellas.

65 Considerando las variaciones anteriormente mencionadas que tienen actividades biológicamente equivalentes,

puede entenderse que cualquier anticuerpo de esta invención o el ácido nucleico que codifica para el mismo incluye secuencias sustancialmente idénticas a las secuencias expuestas en la lista de secuencias adjunta. Las secuencias sustancialmente idénticas se refieren a aquellas que muestran preferiblemente al menos el 61%, más preferiblemente al menos el 70%, todavía más preferiblemente al menos el 80%, lo más preferiblemente al menos el 90% de similitud de nucleótidos con respecto a las secuencias de la lista de secuencias adjunta, tal como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias. En la técnica se conocen bien métodos de alineación de secuencias para comparación. Se describen diversos programas y algoritmos de alineación en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970); Pearson y Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins y Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151-3(1989); Corpet *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang *et al.*, *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992); y Pearson *et al.*, *Met. Mol. Biol.* 24:307-31(1994). La herramienta de búsqueda de alineaciones locales básica (BLAST) del NCBI (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-10(1990)) está disponible de varias fuentes, incluyendo el centro nacional de información biológica (NCBI, Bethesda, Md.) y en Internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastm, blastx, tblastn y tblastx. Puede accederse a la misma en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Hay una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BI-AST/blasthelp.html>.

Según una realización, la variante de anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de la presente invención es un inmunoconjugado. El presente inmunoconjugado, es decir, variante de anticuerpo-molécula funcional, puede usarse para prevenir, tratar o diagnosticar cánceres que sobreexpresan HER2 ya que HER2 es una molécula expresada sobre la superficie de células cancerosas. La molécula funcional incluye sustancias químicas, radionúclidos, agentes inmunoterápicos, citocinas, quimiocinas, toxinas, agentes biológicos e inhibidores enzimáticos.

La sustancia química es un agente antitumoral tal como, pero sin limitarse a, acivicina, aclarubicina, acodazol, acromicina, adozelesina, alanosina, aldesleukina, alopurinol de sodio, altretamina, aminoglutetimida, amonafida, amplígeno, amsacrina, andrógenos, anguidina, glicinato de afidicolina, asaley, asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bacilo de Calmette-Guerin (BCG), antifolato de Baker, beta-2'-desoxitioguanosina, bisantreno HCl, sulfato de bleomicina, busulfano, butionina-sulfoximina, BWA 773U82, BW 502U83/HCl, BW 7U85 mesilato, ceracemida, carbetímero, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cloroquinoxalina-sulfonamida, clorozotocina, cromomicina A3, cisplatino, cladribina, corticosteroides, *Corynebacterium parvum*, CPT-11, crisnatol, ciclocitidina, ciclofosfamida, citarabina, citemena, maleato de dabis, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina HCl, desazauridina, dexrazoxano, dianhidrogalactitol, diaziquna, dibromodulcitol, didemina B, dietilditiocarbamato, diglicolaldehído, dihidro-5-azacitidina, doxorubicina, equinomicina, edatrexato, edelfosina, eflornitina, disolución de Elliott, elsamitrucina, epirubicina, esorubicina, fosfato de estramustina, estrógenos, etanidazol, etiofós, etopósido, fadrazol, fazarabina, fenretinida, filgrastim, finasterida, ácido flavona-acético, floxuridina, fosfato de fludarabina, 5-fluorouracilo, Fluosol™, flutamida, nitrato de galio, gemcitabina, acetato de goserelina, hepsulfama, hexametileno-bisacetamida, homoharringtonina, sulfato de hidrazina, 4-hidroxiandrostenediona, hidroxurea, idarubicina HCl, ifosfamida, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interleucina 1 alfa y beta, interleucina 3, interleucina 4, interleucina 6, 4-ipomeanol, iproplatino, isotretinoína, leucovorina de calcio, acetato de leuprolida, levamisol, daunorubicina liposómica, doxorubicina encapsulada en liposoma, lomustina, lonidamina, maitansina, clorhidrato de mecloretamina, melfalán, menogarilo, merbarona, 6-mercaptapurina, mesna, residuo de extracción con metanol de bacilo Calmette-Guerin, metotrexato, N-metilformamida, mifepristona, mitoguazona, mitomicina C, mitotano, clorhidrato de mitoxantrona, factor estimulante de colonias de monocitos/macrófagos, nabilona, nafoxidina, neocarzinostatina, acetato de octreotida, ormaplatino, oxaliplatino, paclitaxel, pala, pentostatina, piperazindiona, pipobromán, pirarubicina, piritrexima, clorhidrato de piroxantrona, PIXY-321, plicamicina, porfímero de sodio, prednimustina, procarbazona, progestinas, pirazofurina, razoxano, sargramostim, semustina, espirogermanio, espiromustina, estreptonigrina, estreptoizocina, sulofenur, suramina de sodio, tamoxifeno, tegafur, tenipósido, tereftalamidina, teroxirona, tioguanina, tiotepa, inyección de timidina, tiazofurina, topotecán, toremifeno, tretinoína, clorhidrato de trifluoperazina, trifluridina, trimetrexato, factor de necrosis tumoral, uramustina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina, vinorelbina, vinzolidina, Yoshi 864, zorubicina, arabinósido de citosina, etopósido, melfalán, taxotere, taxol y mezclas de los mismos.

II. Moléculas de ácido nucleico y vectores recombinantes

En otro aspecto de esta invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica para la variante de anticuerpo anti-ErbB2 o fragmento de unión a antígeno de la misma.

El término usado en el presente documento "molécula de ácido nucleico" se refiere de manera exhaustiva a una molécula de ADN (ADNg y ADNc) o ARN, y los nucleótidos básicos de la molécula de ácido nucleico también incluyen análogos con azúcar o base modificado así como nucleótidos naturales (Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, Nueva York (1980); Uhlman y Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584 (1990)). La secuencia de la presente molécula de ácido nucleico que codifica para la región variable de cadena pesada y ligera puede estar modificada. Tal modificación incluye adición, delección o sustitución de nucleótido conservativa o no conservativa.

Según una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica para un dominio variable de cadena pesada codifica para un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 6, y la molécula de ácido

nucleico que codifica para un dominio variable de cadena ligera codifica para un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.

5 Según una realización, la presente molécula de ácido nucleico está comprendida en una molécula de ácido nucleico que codifica para una cadena pesada completa o una cadena ligera completa.

10 La molécula de ácido nucleico de esta invención también incluye una secuencia de nucleótidos que comparte homología sustancial con la secuencia de nucleótidos anterior. La homología sustancial significa que la secuencia de nucleótidos comparte una homología de al menos el 80%, más preferiblemente el 90% y lo más preferiblemente el 95% mediante análisis de alineación de secuencias usando una alineación máxima entre la secuencia de nucleótidos de esta invención y otras secuencias aleatorias y algoritmos habitualmente conocidos por los expertos en la técnica.

15 Todavía en un aspecto adicional de esta invención, se proporciona un vector recombinante que comprende (a) la presente molécula de ácido nucleico que codifica para un dominio variable de cadena pesada; y (b) la presente molécula de ácido nucleico que codifica para un dominio variable de cadena ligera.

20 El término usado en el presente documento "vector" es una herramienta para expresar un gen diana en una célula huésped, incluyendo un vector de plásmido; un vector de cósmido; y un vector de virus tal como un vector de bacteriófago, un vector de adenovirus, un vector de retrovirus y un vector de virus adenoasociado, y preferiblemente un vector de plásmido.

25 Según una realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican para la región variable de cadena ligera y pesada están operativamente unidas a un promotor.

30 El término usado en el presente documento "operativamente unido" se refiere a la unión funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico (por ejemplo, un promotor, secuencia señal o matriz de sitios de unión a factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en la que la secuencia de control de expresión afecta a la transcripción y/o traducción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

35 Según una realización, el vector recombinante comprende (a) una molécula de ácido nucleico que codifica para un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 6; y (b) una molécula de ácido nucleico que codifica para un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.

Según una realización, el vector recombinante comprende la siguiente molécula de ácido nucleico:

(i) una molécula de ácido nucleico que codifica para un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3, y una molécula de ácido nucleico que codifica para un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2;

40 una molécula de ácido nucleico que codifica para un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3, y una molécula de ácido nucleico que codifica para un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5; o

(iii) una molécula de ácido nucleico que codifica para un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, y una molécula de ácido nucleico que codifica para un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 7.

45 El sistema de vector de esta invención puede realizarse mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica y su método práctico se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).

50 Normalmente, el vector de esta invención puede construirse como vector de clonación o de expresión. Además, el vector de esta invención puede construirse usando una célula procariota o eucariota como célula huésped. Por ejemplo, resulta común incluir un promotor fuerte para la transcripción (por ejemplo, promotor tac, promotor lac, promotor lacUV5, promotor lpp, promotor p_L^λ, promotor p_R^λ, promotor rac5, promotor amp, promotor recA, promotor SP6, promotor trp y promotor T7, y así sucesivamente), un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción, y una secuencia de terminación de la transcripción/traducción en el que cada vector de esta invención y célula procariota se usa en un vector de expresión y la célula huésped *E. coli* (por ejemplo, HB101, BL21, DH5α, etc.) como célula huésped puede usar una región de promotor y de operador para la ruta de biosíntesis de triptófano (Yanofsky, C, J. Bacteriol., 158:1018-1024 (1984)), y promotor p_L^λ (Herskowitz, I. y Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445 (1980)) como región reguladora. Un bacilo como célula huésped puede usar el promotor de un gen de proteína tóxica de *Bacillus thuringiensis* (Appl. Environ. Microbiol. 64:3932-3938(1998); Mol. Gen. Genet. 250:734-741(1996)), o cualquier promotor que permite expresarse en bacilo como región reguladora.

65 El vector adecuado usado en esta invención puede construirse manipulando un plásmido (ejemplo: pCL, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, serie pGEX, serie pET y pUC19), un fago (ejemplo: λgt41λB, λ-Charon, λΔzl y M13) o un virus (ejemplo: SV40) usado comúnmente por un experto habitual en la técnica.

Según una realización, el vector recombinante se construye usando vector de expresión pCL o pCLS05 (solicitud de patente coreana n.º 10-2011-0056685).

5 Por otro lado, cuando el presente vector es un vector de expresión, y su célula huésped es una célula eucariota, puede usarse el promotor derivado del genoma de célula animal (ejemplo: promotor de metalotioneína, promotor de β -actina, promotor de hemoglobina humana y promotor de creatina muscular humana) o virus de mamífero (ejemplo: promotor tardío de adenovirus, promotor 7.5K del virus vaccinia, promotor de SV40, promotor de citomegalovirus, promotor tk de VHS, promotor del virus de tumor de mama de ratón (VTMR), promotor LTR de VIH, promotor de virus de Moloney, virus de Epstein Barr (VEB) y virus del sarcoma de Rous (VSR)), y comúnmente puede usarse una secuencia poliadenilada como secuencia de terminación de la transcripción. En una realización, el vector de esta invención incluye un promotor de CMV.

15 El vector de esta invención puede fusionarse con otras secuencias para purificar un anticuerpo expresado a partir de mismo. Por ejemplo, una secuencia fusionada incluye glutatión-S-transferasa (Pharmacia, EE.UU.), proteína de unión a maltosa (NEB, EE.UU.), FLAG (IBI, EE.UU.) y 6x His (hexahistidina; Quiagen, EE.UU.) y así sucesivamente. Dado que la proteína expresada en el vector de la presente invención es un anticuerpo, el anticuerpo expresado también puede purificarse a través de columna de proteína A de una manera sencilla sin secuencias de adición para la purificación.

20 Por otro lado, el vector de expresión de esta invención incluye un gen de resistencia a antibióticos conocido por los expertos habituales en la técnica como marcador de selección, por ejemplo genes de resistencia frente a ampicilina, gentamicina, carbenicilina, cloranfenicol, estreptomina, kanamicina, geneticina, neomicina y tetraciclina.

25 En el vector que expresa el anticuerpo o parte del mismo de la presente invención, es posible usar un sistema de vector que expresa conjuntamente la cadena ligera y pesada en un único vector o el otro sistema de vector que expresa cada una de la cadena ligera y pesada en un vector independiente. En este último sistema, ambos vectores se introducen en la célula huésped mediante cotransformación o transformación dirigida. La cotransformación es un método en el que cada ADN de vector que codifica para un gen de cadena ligera y pesada se introduce simultáneamente en las células huésped y después se seleccionan los vectores que expresan cadenas tanto ligera como pesada. En la transformación dirigida, se seleccionan células transformadas con un vector que contiene un gen de cadena ligera (o cadena pesada), y se transforman de nuevo las células seleccionadas que expresan la cadena ligera (o cadena pesada) con un vector que contiene un gen de cadena pesada (o cadena ligera) para seleccionar finalmente células que expresan cadenas tanto ligera como pesada. Tal como se describe en los ejemplos a continuación, el anticuerpo se preparó mediante el sistema de vector que coexpresaba las cadenas ligera y pesada en un único vector.

III. Transformantes

40 Todavía en otro aspecto de esta invención, se proporciona una célula huésped transformada con el vector recombinante anteriormente descrito.

45 Como células huésped en las que se clona y se expresa de manera estable y sucesiva el presente vector, también se usa una cualquiera conocida por los expertos en la técnica, por ejemplo células huésped procariotas incluyendo *Escherichia coli*, cepas de *Bacillus* sp. tales como *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas putida*, *Proteus mirabilis*) o *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus carnosus*), pero no se limitan a las mismas.

50 La célula huésped eucariota adecuada del vector anterior incluye hongos (por ejemplo, especies de *Aspergillus*), levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* y *Neurospora crassa*), otras células eucariotas inferiores y células derivadas de células eucariotas superiores tales como células de insectos. Además, pueden usarse células derivadas de mamíferos como células huésped. Preferiblemente, las células huésped incluyen, pero no se limitan a, células COS7 (células de riñón de mono), células NSO, SP2/0, células CHO (de ovario de hámster chino), W138, células BHK (de riñón de cría de hámster), MDCK, línea celular de mieloma, células HuT 78 y células 293. Más preferiblemente, la célula huésped es célula CHO.

55 El método que usa microorganismos tales como *E. coli* tiene una mayor productividad que el que usa células animales, pero no es adecuado para producir un anticuerpo de Ig intacto debido a la glicosilación. Sin embargo, el método puede usarse en la producción de Fab y Fv.

60 En esta memoria descriptiva, "transformación" y/o "transfección" introducidas en las células huésped también incluye uno cualquiera de los métodos mediante los cuales se introduce el ácido nucleico en organismos, células, tejidos u órganos y puede realizarse mediante selección de una técnica convencional adecuada según las células huésped, tal como conocen los expertos en la técnica. Estas técnicas convencionales incluyen, pero no se limitan a, electroporación, fusión de protoplastos, precipitación con CaPO_4 , precipitación con CaCl_2 , agitación con fibra de carburo de silicio, transformación mediada por agrobacterias, y transformación mediada por PEG, sulfato de

dextrano, lipofectamina e inhibición en seco.

IV. Método de preparación de la variante de anticuerpo anti-ErbB2 o fragmento de unión a antígeno de la misma

5 Todavía en un aspecto adicional de esta invención, se proporciona un método de preparación de la variante de anticuerpo anti-ErbB2 o fragmento de unión a antígeno de la misma, que comprende: (a) cultivar una célula huésped transformada con el presente vector recombinante; y (b) expresar una variante de anticuerpo anti-ErbB2 o fragmento de unión a antígeno de la misma en la célula huésped.

10 El cultivo de células huésped transformadas en la preparación de anticuerpo puede llevarse a cabo según medios y condiciones de cultivo adecuados bien conocidos en la técnica. El procedimiento de cultivo puede manipularse de manera fiable según cepas seleccionadas conocidas por los expertos en la técnica. Se dan a conocer diversos procedimientos de cultivo en diversas referencias (por ejemplo, James M. Lee, Biochemical Engineering, Prentice-Hall International Editions, 138-176). El cultivo celular se divide en método de cultivo en suspensión y adhesión
15 según el patrón de crecimiento celular y en cultivo discontinuo, de fermentación y continuo según el método de cultivo. El medio usado en el cultivo tiene que satisfacer condiciones requeridas de la cepa particular.

El medio para el cultivo de células animales incluye diversas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y oligoelementos. El ejemplo de fuentes de carbono que van a usarse incluye un hidrato de carbono tal como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa, un lípido tal como aceite de semilla de soja, de girasol, de ricino y de coco, un ácido graso tal como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, un alcohol tal como glicerol y etanol, y un ácido orgánico tal como acetato. Estas fuentes de carbono pueden usarse o bien solas o bien en combinación entre sí. El ejemplo de fuentes de nitrógeno que van a usarse incluye una fuente de nitrógeno orgánico tal como peptona, extracto de levadura, extracto de malta, líquido de maceración de maíz (CSL) y semilla
20 de soja-trigo, y una fuente de nitrógeno inorgánico tal como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse o bien solas o bien en combinación entre sí. El medio puede incluir no sólo KH_2PO_4 , K_2HPO_4 y sales que contienen sodio de los mismos como fuente de fosfato sino también sales de metales tales como sulfato de magnesio y sulfato de hierro. Además, el medio puede incluir aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados.

30 Durante el cultivo, el pH de la disolución de cultivo puede ajustarse añadiendo compuestos químicos tales como hidrato de amonio, hidrato de potasio, amoníaco, fosfato y sulfato de una manera predeterminada. También puede inhibirse la producción de burbujas usando un agente antiespumante tal como éster de poliglicol durante el cultivo. Mientras tanto, se introduce oxígeno o gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire) en el cultivo para mantener el estado aeróbico del cultivo. La temperatura de cultivo se mantiene en un intervalo de desde 20°C hasta 45°C, y preferiblemente desde 25°C hasta 40°C.

Anticuerpos obtenidos durante el cultivo de células huésped transformadas pueden usarse en un estado no purificado y pueden usarse mediante purificación con alta pureza según diversos métodos convencional adicionales, por ejemplo diálisis, precipitación de sal y cromatografía. Entre ellos, se usa la cromatografía como el método más útil y pueden seleccionarse clases y tipos de columna de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad según características de anticuerpo, métodos de cultivo, y así sucesivamente.

45 V. Composiciones farmacéuticas o métodos para prevenir o tratar un cáncer

Todavía en un aspecto adicional de esta invención, se proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar un cáncer, que comprende: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de la variante de anticuerpo anti-ErbB2 o fragmento de unión a antígeno de la misma; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

50 La presente invención también da a conocer un método de prevención o tratamiento de un cáncer, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica.

El término usado en el presente documento "prevención" se usa en el sentido más amplio para incluir el bloqueo completo o parcial y la ralentización de la progresión de la enfermedad así como el retraso de la aparición de la forma más grave de la enfermedad, y el término "tratamiento" incluye la inhibición parcial o total del crecimiento de cáncer, así como la destrucción parcial o total de las células cancerosas.

60 Según una realización, el cáncer es cáncer que sobreexpresa HER2. En una realización específica, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, carcinoma de células renales, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer endometrial, tumor de la glándula salivar, cáncer de colon y cáncer de tiroides. En otra realización, el cáncer es cáncer de mama o cáncer gástrico. Tal como se usa en el presente documento, el término "cáncer que sobreexpresa HER2" se refiere a un cáncer que tiene un nivel significativamente superior de HER2
65 expresado en la superficie celular en comparación con células no cancerosas. Esta sobreexpresión puede inducirse mediante amplificación génica o un aumento en la transcripción o traducción.

El portador farmacéuticamente aceptable puede ser uno convencional para la formulación, incluyendo lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica de caucho, fosfato de potasio, arginato, gelatina, silicato de potasio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabes, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, y aceites mineral, pero sin limitarse a ello. La composición farmacéutica según la presente invención puede incluir además un lubricante, un humectante, un edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión y un conservante. Pueden encontrarse detalles de portadores farmacéuticamente aceptables y formulaciones adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences (19^a ed., 1995).

La composición farmacéutica según la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral, puede realizarse mediante administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, endotelial, local, al bazo, pulmonar o rectal. Para la administración oral, los principios activos de composiciones orales pueden recubrirse o formularse para protegerse frente a la hidrólisis en el estómago. Además, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante cualquier dispositivo en el que se llevan principios activos al interior de células seleccionadas como diana.

Una dosis adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo de métodos de formulación farmacéutica, métodos de administración, la edad del paciente, el peso corporal, el sexo, la intensidad de enfermedades, dieta, tiempo de administración, vía de administración, tasa de excreción y sensibilidad para una composición farmacéutica usada. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención se administra con una dosis diaria de 0,001-100 mg/kg (peso corporal). El término "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad adecuada para prevenir o tratar el cáncer.

Según las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, la composición farmacéutica puede formularse con un vehículo y/o portador farmacéuticamente aceptable tal como se describió anteriormente, proporcionando finalmente varias formas incluyendo una forma de dosis unitaria y una forma de múltiples dosis. La formulación puede ser en medios aceitosos o acuosos, en resuspensión o emulsión, extracto, polvo, gránulo, comprimido y cápsula y comprender además un dispersante o estabilizante.

Las composiciones de anticuerpo de esta invención pueden administrarse independientemente como agente terapéutico o administrarse secuencial o simultáneamente con un agente terapéutico convencional.

La variante de anticuerpo de esta invención puede administrarse a un sujeto en forma de un conjugado de variante de anticuerpo-agente terapéutico (moléculas funcionales) para tratar cánceres, tal como se describió anteriormente. Se han notificado diversos estados apropiados y deseables para dirigir fármacos a sitios diana específicos, por ejemplo, en *Plenum Press*, Nueva York y Londres, (1982) 19-30.

Las características y ventajas de esta invención se resumirán de la siguiente manera:

(a) Las variantes de anticuerpo de la presente invención pueden unirse a ErbB2 con alta afinidad. Especialmente, la afinidad de las presentes variantes de anticuerpo por ErbB2 se mejora hasta un máximo de 8 veces en comparación con el anticuerpo terapéutico convencional 4D5.

(b) Las variantes de anticuerpo de la presente invención tienen una actividad inhibidora superior frente a la proliferación de células cancerosas. Especialmente, la actividad inhibidora de las presentes variantes de anticuerpo frente a la proliferación de células de cáncer gástrico es aproximadamente 3,5 veces superior a la de 4D5.

(c) Por tanto, las variantes de anticuerpo de la presente invención pueden prevenir o tratar eficazmente diversos cánceres con una baja cantidad.

Ahora se describirá la presente invención con más detalle mediante ejemplos. Resultará obvio para los expertos en la técnica que se pretende que estos ejemplos sean más concretamente ilustrativos y el alcance de la presente invención tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas se limita a los anticuerpos AH06, A058 y A091. Los demás anticuerpos dados a conocer a continuación en el presente documento se implementan como anticuerpos comparativos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de biblioteca de scFv con presentación en fago que tiene diversas CDR

Se construyeron bibliotecas de scFv con presentación en fago usando un vector fagémido que se diseñó para presentar scFv y pIII en forma de fusión. La estructura del vector se muestra esquemáticamente en la figura 1. El vector comprende un dominio variable de anticuerpo bajo el control de un promotor P_{lac} inducible por IPTG, y su secuencia de ligador es GGGSGGGSGGSS (SEQ ID NO: 8). En las patentes estadounidenses n.ºs 5.821.337 y 6.054.297 se dan a conocer un método de preparación de un anticuerpo anti-ErbB2 (4D5, anticuerpo original) y sus

secuencias de dominio variable.

Se usó una versión de “molde de terminación” único del vector de presentación de scFv para generar bibliotecas. Se usó un vector fagémido de molde denominado pCMTG (IG Terapia Co., Corea) con codón de terminación TGA insertado en la posición 48 (posición de residuo según Kabat) de la cadena ligera. No se introdujo ningún codón de terminación en la CDR3 de cadena pesada. Se usaron oligonucleótidos mutagénicos con codones NNK degenerados en las posiciones que iban a diversificarse para introducir simultáneamente diversidad de CDR y eliminar el codón de terminación, mediante lo cual se generó un marco de lectura abierto que codificaba para un miembro de la biblioteca de scFv fusionado con un c-myc de formación de homodímeros y pIII.

En primer lugar se modificaron las regiones CDR3 de cadena pesada y cadena ligera. Para modificar la región CDR3 de cadena pesada, se llevó a cabo PCR usando un conjunto de cebadores de HF (SEQ ID NO: 19) y LNO1_R (SEQ ID NO: 9), y un conjunto de cebadores de HF (SEQ ID NO: 19) y LNO1_R (SEQ ID NO: 10). Se realizó la amplificación mediante PCR usando un termociclador Bio-Rad C1000 según las instrucciones del fabricante (Ex taq, Takara, Japón). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización, 95°C durante 20 s; hibridación, 57°C durante 30 s; extensión, 72°C durante 45 s; 27 ciclos. Para modificar la región CDR3 de cadena ligera, se llevó a cabo PCR usando un conjunto de cebadores de LN03_F (SEQ ID NO: 11) y LR (SEQ ID NO: 17), y un conjunto de cebadores de LN04_F (SEQ ID NO: 12) y LR (SEQ ID NO: 17). Las condiciones de PCR fueron las mismas que las descritas anteriormente.

Para construir una biblioteca en la que se introdujeron mutaciones al azar en CDR2 de cadena ligera, se llevó a cabo PCR dos veces usando anticuerpos seleccionados de variantes de CDR3 de cadena pesada y ligera como molde y codones NNK. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización, 95°C durante 20 s; hibridación, 57°C durante 30 s; extensión, 72°C durante 45 s, 27 ciclos. Se preparó fragmento A usando LF (SEQ ID NO: 18) como cebador directo y una mezcla de cebadores (razón 1:1) de LNO5_R (SEQ ID NO: 13) y LNO6_R (SEQ ID NO: 14) como cebador inverso, y se preparó fragmento B usando un conjunto de cebadores de LNO506_F (SEQ ID NO: 15) y HR (SEQ ID NO: 20). Después, se realizó la PCR usando los fragmentos A y B como molde, y un conjunto de cebadores de LF (SEQ ID NO: 18) y HR (SEQ ID NO: 20). Además, se preparó una biblioteca adicional usando anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en una variante de CDR3 de cadena pesada y dos variantes (CDRL2, CDRL3) de cadena ligera como molde, y LF (SEQ ID NO: 18) y LN07_R (SEQ ID NO: 16) como cebador.

Con el fin de construir una biblioteca de anticuerpos en la que se introdujeron mutaciones al azar dirigidas a todas las CDR y regiones de entramado, se llevó a cabo PCR propensa a errores dos veces usando variantes de CDR3 de cadena pesada, CDR3 de cadena ligera y CDR2 de cadena ligera seleccionadas de la biblioteca como molde, de la siguiente manera: la primera PCR cuyas condiciones de amplificación eran 32 ciclos de desnaturalización durante 20 s a 95°C, hibridación durante 30 s a 57°C, y extensión durante 45 s a 72°C, se llevó a cabo usando el kit de mutagénesis al azar GeneMorphII (Stratagene, EE.UU.), amplificando así fragmentos que contenían una cadena ligera o una cadena pesada mediante un conjunto de cebadores de LF (SEQ ID NO: 18) y LR (SEQ ID NO: 17), y HF (SEQ ID NO: 19) y HR (SEQ ID NO: 20), respectivamente. Después, mediante la segunda PCR usando Ex taq (Takara, Japón), se amplificaron los dos fragmentos de PCR resultantes que contenían una cadena ligera o una cadena pesada usando un conjunto de cebadores de LF (SEQ ID NO: 18) y HR (SEQ ID NO: 20), preparando así una biblioteca de scFv. Las condiciones de amplificación de la segunda PCR fueron 20 ciclos de desnaturalización durante 20 s a 95°C, hibridación durante 30 s a 58°C, y extensión durante 45 s a 72°C. En la tabla 1 se muestra cada secuencia de cebador usado para la PCR.

[Tabla 1]

Cebadores	Secuencias	SEQ ID NO.
LN01_R	ACTAGTGCTACTCACGGTCACCAGAGTCCCTGTCCCCAGTAATCCAT GGCGTAMNNGCCMNNMNNMNNMNNNTCTAGAGCAGTAGTAC	SEQ ID NO: 9
LN02_R	ACTAGTGCTACTCACGGTCACCAGAGTCCCTGTCCCCAMNNMNNMN NMNNGTAGAAGCCATCACC	SEQ ID NO: 10
LN03_F	GACTTCGCTACGTACTACTGCNNKNNKNNKNNKACCACTCCTCCGAC	SEQ ID NO: 11
LN04_F	GACTTCGCTACGTACTACTGCCAACAGCACTACNNKACTNNKNNKNN KTTCCGGACAAGGCAC	SEQ ID NO: 12
LN05_R	TGAATCTAGATGGCACACCMNNMNNMNNMNGAAMNNMNNMNNMNGTAGA TCAGCAGCTTC	SEQ ID NO: 13
LN06_R	TGAATCTAGATGGCACACCMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNGTAGA TCAGCAGCTTC	SEQ ID NO: 14

LN0506_F	GGTGTGCCATCTAGATTCAGTG	SEQ ID NO: 15
LN07_R	ACTAGTGCTACTCACGGTCACCAGAGTTCCTGTCCCCAGTAATCCAT MNINGTAMNNGCCMNNMNNMNNMNTCTAGAGCAGTAGTAC	SEQ ID NO: 16
LR	GCGCGCTACTCACGGTC	SEQ ID NO: 17
LF	GGCCCAGGCGGCCGATATCCAGATGAC	SEQ ID NO: 18
HF	GAGCTCATGGATATCCAGATGACCCAGAG	SEQ ID NO: 19
HR	GCGCGCTACTCACGGTC	SEQ ID NO: 20

El anticuerpo original comprende secuencias de aminoácidos de dominios variables del anticuerpo humanizado 4D5 (tabla 2).

5 [Tabla 2]

	Secuencias de aminoácidos	SEQ ID NO.
V _H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGLTVVSS	SEQ ID NO: 1
V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSA SFLYSGVPSRFSGSRSGDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTK VEIK	SEQ ID NO: 2

10 Las bibliotecas preparadas LN01 y LN02 tienen residuos aleatorizados en una región CDRH3, y las bibliotecas preparadas LN03 y LN04 tienen residuos aleatorizados en una región CDRL3. Además, las bibliotecas preparadas LN05, LN06 y LN07 tienen residuos aleatorizados en las regiones CDRL2, CDRL3 y CDRH3. Los residuos aleatorizados se describen en la tabla 3. Las posiciones de CDR se numeran según el sistema de Kabat. Una biblioteca preparada mediante PCR propensa a errores, que tiene variantes en regiones de entramado así como CDR, se denominó LN08.

[Tabla 3]

Bibliotecas	Posiciones aleatorizadas		
	CDRL2	CDRL3	CDRH3
LN01	-	-	95, 96, 97, 98, 100
LN02	-	-	100b, 100c, 101, 102
LN03	-	89, 90, 91, 92	-
LN04	-	93, 95, 96, 97	-
LN05	50, 51, 52, 54, 55, 56	93, 95, 96, 97	95, 96, 97, 98, 100
LN06	50, 51, 52, 54, 55, 56	93, 95, 96, 97	100b, 100c, 101, 102
LN07	50, 51, 52, 54	93, 96, 97	96, 97, 98, 100b, 100c, 101, 102

15 Se introdujeron las bibliotecas en *E. coli* XL1-blue-MRF' (200158, Stratagene, EE.UU.) mediante electroporación (Sidhu *et al.* Methods Enzymol. 328:333-363(2000)), y se cultivaron los transformantes durante la noche en presencia de fagos cooperadores Ex12 (IG therapy, Corea) para encapsular ADN de fagémido, generando así partículas de fago que presentaban fragmentos de scFv sobre su superficie. Cada biblioteca contenía más de 5 x 10⁸ miembros.

Ejemplo 2. Selección de anticuerpos específicos para ErbB2 a partir de bibliotecas de scFv

25 Se seleccionaron anticuerpos específicos para ErbB2 de las bibliotecas de anticuerpos del ejemplo 1. Se recubrieron inmunoplaquetas Maxisorp de 96 pocillos NUNC durante la noche con 2 µg/ml de diana de captura a 4°C, y se bloquearon con solución salina tamponada con Tris SuperBlock™ (Pierce) durante 2 horas. Se cultivaron fagos durante la noche y se enriquecieron, seguido por resuspensión del fago enriquecido en TBS SuperBlock™ y Tween 20 al 0,05% (Sigma). Se añadieron las disoluciones de fagos a las placas recubiertas a una concentración de 10¹² partículas de fago/ml, y se incubaron durante 2 horas. Se lavaron las placas 10 veces con PBS y Tween 20 al

0,05%. Después, se eluyeron fagos unidos con glicina 0,1 M (pH 2,2) durante 10 minutos, y posteriormente se neutralizó la disolución eluida con Tris/Cl 1 M (pH 9,0). Se propagó el eluyente en *E. coli* XL1-blue-MRF'.

5 Fue difícil seleccionar un anticuerpo que tuviera afinidad mejorada ya que el anticuerpo original ya tenía una alta afinidad (valor de K_D de picomoles). Por tanto, se usaron tres modos de seleccionar un anticuerpo que tuviera una afinidad superior a la del anticuerpo original. En el primer modo, se llevó a cabo un lavado durante un máximo de 44 horas para seleccionar un anticuerpo que mostraba una velocidad de disociación potenciada (Chen *et al.* J Mol Biol. 293:865-81(1999)). En el segundo modo, se realizó una elución previa con glicina 0,1 M (pH 2,2) antes de la elución final (Bruin *et al.* Nat Biotechnol. 17(4):397-9 (1999)). En el tercer modo, se retiraron anticuerpos unidos de manera débil mediante tratamiento con tiocianato de amonio antes de la elución (Macdonald *et al.* J Immunol Methods 106:191-4(1988); Wang *et al.* J Immunol Methods. 241(1-2):171-84(2000); Hur *et al.* Immunol Lett. 134(1):55-61(2010)).

15 Tras la selección, se hicieron crecer clones individuales en un formato de 96 pocillos en 500 µl de caldo 2YT complementado con carbenicilina y ampicilina, y se usaron los sobrenadantes de cultivo en ELISA de fagos para detectar scFv presentado en fago que se unía a placas recubiertas con antígeno pero no a placas recubiertas con BSA (figura 2). Se determinó un clon que mostraba un valor de DO de más de 0,5 en las placas recubiertas con antígeno en comparación con las placas recubiertas con BSA y mantenía una fuerza de unión en presencia de tiocianato de amonio 1,0 M, como variante específica para ErbB2. Tras repetir los experimentos 4-5 veces, se seleccionaron las variantes específicas para ErbB2 examinando los clones individuales de las bibliotecas.

25 Se sometieron las variantes específicas para ErbB2 a análisis de secuencia de ADN. Como resultado, se identificó que una variante específica para ErbB2 (AH06) tenía sustituciones de aminoácido en las posiciones 98, 100c, 101 y 102 (posición de residuo según Kabat) del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo original 4D5, y que las otras variantes tenían sustituciones de aminoácido adicionales en las posiciones de Kabat 41, 96, 97 ó 100b del dominio variable de cadena pesada, y/o en las posiciones de Kabat 50, 51, 52, 53, 54, 72, 91, 93, 96 ó 97 del dominio variable de cadena ligera así como las sustituciones de aminoácido descritas anteriormente.

30 Se combinó cada residuo sustituido para seleccionar variantes específicas para ErbB2 óptimas. Las variantes específicas para ErbB2 seleccionadas se denominaron AH06, AH16, A058 o A091. La cadena pesada del anticuerpo humanizado AH06 era una variante de la cadena pesada del anticuerpo 4D5, y comprendía las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 3. El anticuerpo humanizado AH16 comprendía las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4. El anticuerpo humanizado A058 comprendía las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 5. El anticuerpo humanizado A091 comprendía las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 7. En la tabla 4 se describen las secuencias de aminoácidos de sus dominios variables de cadena pesada y ligera. Además, las figuras 3 y 4 dan a conocer resultados de comparación de las secuencias de aminoácidos entre el anticuerpo 4D5 y los anticuerpos seleccionados.

[Tabla 4]

	Secuencias de aminoácidos	SEQ ID NO.
V _H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGWGFYAFALWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO: 3
V _H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWNAKGFYSFVHWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO: 4
V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHY QTPASFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 5
V _H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQARGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGWGFYAFALWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO: 6
V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYTTTWPYSGVPSRFSGRSGTDFSLTISLQPEDFATYYCQQYY NTPVTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 7

Ejemplo 3. Construcción de vectores que expresan cadenas pesada y ligera de anticuerpo anti-ErbB2

Se usó un vector de expresión (pCLS05, dado a conocer en la solicitud de patente coreana n.º 2011-0056685) para sustituir genes de dominio variable de los anticuerpos humanizados (scFv) preparados en el ejemplo 1 por genes completos de un anticuerpo humanizado. En primer lugar, para insertar el gen de V_H de los anticuerpos en el vector de expresión, se escindió el gen de V_H con enzimas de restricción *EcoRI*/*XhoI* (NEB, EE.UU.) durante 2 horas a 37°C, seguido por identificación de fragmentos de genes de 1,4 kb mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y tinción con bromuro de etidio. De manera similar, también se escindió el vector de expresión pCLS05 con enzimas de restricción *EcoRI*/*XhoI*, y se identificó un vector de expresión escindido de aproximadamente 7,5 kb. Después, se recuperó cada fragmento de gen usando el kit de extracción en gel QIA (Qiagen, EE.UU.), y después se hizo reaccionar durante la noche a 16°C usando ADN ligasa T4 (Takara Holdings, Japón), seguido por transformación de *E. coli* DH5a. Se cultivaron los transformantes resultantes durante la noche en medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina, seguido por recolección de plásmidos. Se identificó mediante análisis de secuencia que se había insertado el gen completo de la cadena pesada en el vector.

Para insertar un gen completo de la cadena ligera en el vector de expresión pCLS05 que tenía el gen completo de la cadena pesada de anticuerpo humanizado, se escindió un gen completo de la cadena ligera con enzimas de restricción *HindIII*/*Bam-HI* (NEB, EE.UU.) durante 2 horas a 37°C, seguido por identificación de un fragmento de gen con un tamaño de 0,7 kb mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y tinción con bromuro de etidio. De manera similar, también se escindió el vector de expresión pCLS05 con enzimas de restricción *EcoRI*/*XhoI*, y se identificó un vector de expresión escindido con un tamaño de aproximadamente 8,8 kb. Después, se recuperó cada fragmento de gen usando el kit de extracción en gel QIA (Qiagen, EE.UU.), y después se hizo reaccionar durante la noche a 16°C usando ADN ligasa T4 (Takara Holdings, Japón), seguido por transformación de *E. coli* DH5a. Se cultivaron los transformantes resultantes durante la noche en medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina, seguido por recolección de plásmidos. Se identificó mediante análisis de secuencia que se había insertado el gen completo de la cadena ligera en el vector.

Ejemplo 4. Transformación para la expresión de anticuerpos humanizados

Para medir la actividad del anticuerpo humanizado, se transformaron células CHO-s FreeStyle™ (n.º R800-07, Invitrogen) con el vector de expresión tal como se preparó en el ejemplo 3. Se usó un medio de expresión de células CHO FreeStyle™ (Invitrogen, EE.UU.) complementado con L-glutamina 8 mM (25030-081, Gibco) para cultivar células CHO. Se incubaron las células durante 2-3 días a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% humidificada, seguido por recolección de las células mediante centrifugación a 1.200 rpm durante 5 min a 25°C. Después se tiñeron las células recogidas con azul tripano al 0,4% (Fluka), y se contaron las células teñidas mediante un hematocitómetro.

Se subcultivaron las células CHO-s en un nuevo medio para obtener células que tenían una densidad celular de 5 x 10⁵ células/ml y una viabilidad de > 95%. Tras hacer reaccionar 132 µg del vector de expresión y 130 µl de reactivo MAX FreeStyle™ (n.º 16447-100, Invitrogen) durante 10 min, se mezcló el reactante resultante con las células preparadas, seguido por cultivo durante 5 días en una incubadora de CO₂ (37°C, CO₂ al 5%, agitador orbital a 110 rpm).

Ejemplo 5. Purificación de anticuerpos humanizados

Se obtuvieron anticuerpos humanizados cultivando el transformante tal como se preparó en el ejemplo 4 y purificando anticuerpos de la siguiente manera. Se incubaron células (5 x 10⁷) en medio de expresión de células CHO FreeStyle™ (100 ml) en un matraz Erlenmeyer (500 ml) durante 5 días a 37°C usando una incubadora de CO₂ al 5% humidificada. Tras recoger y centrifugar una disolución de cultivo celular, se filtró el resultante para obtener una disolución de cultivo que sólo contenía anticuerpos. Se usó una columna de cromatografía desechable (732-1010, BIO-RAD) empaquetada con 1 ml de resina Mabsselect que tenía una capacidad de unión de 30 mg de IgG humana/ml (17-5199-01, GE Healthcare) para purificar únicamente anticuerpos de la disolución de cultivo. Se hizo pasar la disolución de cultivo celular en la que se expresaban los anticuerpos a través de la columna Mabsselect para unir los anticuerpos con proteína A, y se hizo pasar tampón de citrato de sodio 0,1 M para eluir los anticuerpos unidos a proteína A. Se neutralizó la disolución eluída con anticuerpos añadiendo tampón de Tris-Cl (pH 9,0) en un volumen de 1/10 de la disolución eluída.

Se realizó un cambio de tampón por PBS (pH 7,4). Se aplicó una muestra de anticuerpo preparada a VIVASPIN humedecido con PBS (MWCO de 30000, Sartorius, n.º de cat. VS2021), seguido por centrifugación a 3.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se realizó un cambio de tampón más de 1.000 mediante una centrifugación de 3 veces.

Se determinó el anticuerpo purificado usando un gradiente del 4-12% de minigeles de bis-Tris NuPAGE Novex (Invitrogen, n.º de cat. NP0321). Como resultado, tal como se muestra en la figura 5, se determinaron una banda de proteína de cadena pesada (peso molecular de 50.000 Da) y una banda de proteína de cadena ligera (peso molecular de 25.000 Da) (figura 5).

Ejemplo 6. Medición de afinidad de anticuerpos anti-ErbB2

Se midió la afinidad de unión de las presentes variantes de anticuerpo anti-ErbB2 por ErbB2. Se obtuvieron datos de BIAcore tal como se describió anteriormente (Chen *et al.* J Mol Biol. 293(4):865-81(1999)). En resumen, se estimaron las afinidades de unión de las variantes de anticuerpo por ErbB2 a partir de constantes de velocidad de asociación y disociación medidas usando el sistema de resonancia de plasmón superficial BIAcore™-2000 (BIAcore, Inc.). Se inmovilizaron antígenos sobre la superficie de un chip de sensor M5 usando un método de acoplamiento de tipo amino, tal como se describió anteriormente (Analyt. Biochem. 198:268-277(1991)). Se acopló ErbB2 de manera covalente mediante activación del chip de biosensor usando EDC (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida). Se sometió ErbB2 a intercambio de tampón en acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, y se diluyó hasta aproximadamente 30 µg/ml. Se inyectaron alícuotas de ErbB2 a una velocidad de flujo de 5 µl/min para lograr aproximadamente 250-300 unidades de respuesta (UR) de proteínas acopladas. Se inyectó una disolución de etanolamina 1 M como agente de boqueo. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 nM desde la concentración inferior hasta la concentración superior a una velocidad de flujo de 10 µl/min durante 5 min, seguido por disociación mediante la inyección de un tampón de corrida buffer durante 30 min. Se calcularon valores de constantes de disociación en equilibrio, K_D , a partir de medidas de resonancia de plasmón superficial como k_{on}/k_{off} . A continuación se resumen los datos de BIAcore™.

[Tabla 5]

	Constante de asociación (k_{on} , 1/Ms)	Constante de disociación (k_{off} , 1/s)	Afinidad por antígeno (K_D , M)
4D5	$2,09 \times 10^5$	$8,82 \times 10^{-5}$	$4,22 \times 10^{-10}$
D98W	$3,97 \times 10^5$	$8,89 \times 10^{-5}$	$2,24 \times 10^{-10}$
AH06	$8,80 \times 10^5$	$4,42 \times 10^{-5}$	$5,02 \times 10^{-11}$
AH16	$4,04 \times 10^5$	$1,20 \times 10^{-4}$	$2,97 \times 10^{-10}$
A058	$5,22 \times 10^5$	$2,78 \times 10^{-4}$	$5,33 \times 10^{-10}$
A091	$6,44 \times 10^5$	$6,88 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^{-9}$

Tal como se muestra en la tabla 5, la afinidad de D98W tal como se notificó en Resi *et al.* 21:851-862(2002) mostró un valor de K_D de 224 pM, lo cual era un valor 2 veces mayor que el del anticuerpo original 4D5 (valor de K_D : 422 pM), mientras que la afinidad de la presente variante de anticuerpo anti-ErbB2, AH06, mostró un valor de K_D de 50,2 pM, lo cual era un valor 8 veces mayor que el de 4D5. Además, la afinidad de la presente variante de anticuerpo anti-ErbB2, AH16, mostró un valor de K_D de 297 pM, lo cual era un valor aproximadamente 2 veces mayor que el de 4D5 (tabla 5).

Estos resultados muestran claramente que la afinidad de las presentes variantes de 4D5 por el antígeno mejoraron notablemente con respecto a la del anticuerpo original 4D5.

Ejemplo 7. Efectos inhibidores de anticuerpos anti-ErbB2 sobre la proliferación celular

Para investigar los efectos inhibidores de cada variante de anticuerpo anti-ErbB2 sobre enfermedades mediadas por ErbB2, se evaluaron los efectos inhibidores de la proliferación celular de las variantes de anticuerpo usando una línea celular de cáncer gástrico, células NCI-N87 (n.º de registro de ATCC CRL-5822). Se desprendieron células NCI-N87 mediante tratamiento con tripsina-EDTA, seguido por suspensión de células desprendidas en un medio para obtener una concentración celular de $0,75 \times 10^4$ células/ml, y se inocularon las células resultantes en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 1 ml por pocillo. Tras la inoculación, se cultivaron las células para la unión de célula a 37°C, CO₂ al 5% y se trataron con los anticuerpos humanizados a 10, 1, 0,1, 0,01 ó 0,001 µg/ml usando medio RPMI 1640/FBS al 2%. Tras una reacción durante aproximadamente 6 días, se trató WST-8 (Dojindo) para determinar la reacción con color y después se midió a una longitud de onda de 450 nm.

Las figuras 6-8 muestran los efectos inhibidores de la proliferación celular de las presentes variantes de anticuerpo anti-ErbB2 y del anticuerpo 4D5 sobre las células NCI-N87. Tal como se muestra en las figuras 7 y 8, los efectos inhibidores de la proliferación celular de las presentes variantes de anticuerpo aumentaron hasta aproximadamente 3,5 veces en comparación con 4D5 (anticuerpo original). En cambio, el efecto inhibidor de la proliferación celular de D98W que tiene una afinidad 2 veces mayor en comparación con 4D5 tal como se describió en el ejemplo 6, era igual al de 4D5 (figura 6). Más específicamente, la eficacia del anticuerpo A091 ($CI_{50} = 10,3$ nM) mejoró casi 2 veces en comparación con la de 4D5 ($CI_{50} = 25,4$ nM), y la eficacia del anticuerpo A058 ($CI_{50} = 4,3$ nM) mejoró casi 2,5 veces en comparación con la de 4D5 ($CI_{50} = 10,4$ nM) (figura 7). Además, la eficacia del anticuerpo AH06 ($CI_{50} = 3,4$ nM) mejoró aproximadamente 3,5 veces en comparación con la de 4D5 ($CI_{50} = 11,6$ nM) (figura 8).

Los resultados muestran claramente que las variantes de 4D5 de la presente invención mejoraron no sólo en cuanto a la afinidad sino también en cuanto a la actividad inhibidora de la proliferación celular en comparación tanto con el

anticuerpo original 4D5 como con el anticuerpo D98W.

Habiendo descrito una realización preferida de la presente invención, debe entenderse que variantes y modificaciones de la misma que se encuentran dentro del espíritu de la invención pueden resultar evidentes para los expertos en esta técnica, y el alcance de esta invención debe determinarse mediante las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

<110> Chongkundang

10 <120> Variantes de anticuerpo anti-ErbB2

<130> PP130038

15 <150> Documento KR 10-2012-0048805

<151> 08-05-2012

<160> 20

20 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 120

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos de V_H de 4D5

<400> 1

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

<210> 2

40 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

ES 2 647 962 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de V_L de 4D5

5 <400> 2

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 3

<211> 120

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia de aminoácidos de V_H de variante de 4D5

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

25

<210> 4

ES 2 647 962 T3

<211> 120

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos de V_H de variante de 4D5

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Trp Asn Ala Lys Gly Phe Tyr Ser Phe Val His Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

<210> 5

<211> 107

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de V_L de variante de 4D5

<400> 5

30

ES 2 647 962 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de V_H de variante de 4D5

15 <400> 6

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

20 <210> 7

<211 > 107

<212> PRT

25

ES 2 647 962 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de aminoácidos de VL de variante de 4D5

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 8

<211> 13

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> secuencia de ligador

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser
1 5 10

25

<210> 9

<211> 88

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador LN01_R

<400> 9

40

actagtgcta ctcacggcca ccagagttcc ctgtcccag taatccatgg cgtamngcc 60

mnmnmnmnm nntctagagc agtagtac 88

ES 2 647 962 T3

<210> 10
<211> 66
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
10 <223> Cebador LN02_R
<400> 10
actagtgcta ctcacggctca ccagagttcc ctgtcccccamm nnnnnnnnnmnn ngtagaagcc 60
15 atcacc 66
<210> 11
<211> 47
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> Cebador LN03_F
<400> 11
30 gacttcgcta cgtactactg cnnknnknnk nnkaccactc ctccgac 47
<210> 12
35 <211> 62
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
40 <220>
<223> Cebador LN04_F
45 <400> 12
gacttcgcta cgtactactg ccaacagcac tacnnkactn nknnknnktt cggacaaggc 60
ac 62
<210> 13
50 <211> 56
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador LN05_R
60 <400> 13

ES 2 647 962 T3

tgaatctaga tggcacaccm nnmnmnnga amnmnmnmn gtagtcagc agcttc 56

<210> 14

5 <211> 56

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador LN06_R

15 <400> 14

tgaatctaga tggcacaccm nnmnmnnc amnmnmnmn gtagtcagc agcttc 56

<210> 15

20 <211> 22

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador LN0506_F

30 <400> 15

ggtgtgcat ctgattcag tg 22

35 <210> 16

<211> 88

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Cebador LN07_R

<400> 16

actagtgcta ctcacggca ccagagttcc ctgtcccag taatccatmn ngtamngcc 60

mnmnmnmnm nntctagagc agtagtac 88

50 <210> 17

<211> 17

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Cebador LR

<400> 17

ES 2 647 962 T3

gcgcgctact cacggtc 17

<210> 18

5 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador LF

15 <400> 18

ggcccaggcg gccgatatcc agatgac 27

<210> 19

20

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador HF

30

<400> 19

gagctcatgg atatccagat gaccagag 29

35 <210> 20

<211> 17

<212> ADN

40

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Cebador HR

<400> 20

gcgcgctact cacggtc 17

REIVINDICACIONES

1. Variante de anticuerpo anti-ErbB2 o fragmento de unión a antígeno de la misma, que comprende el siguiente dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera:
- 5 un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3;
- un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3; o
- 10 un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 7 y un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6.
2. Variante de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según la reivindicación 1, que comprende un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3.
- 15 3. Variante de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según la reivindicación 1, que es un anticuerpo humanizado.
4. Molécula de ácido nucleico que codifica para una variante de anticuerpo anti-ErbB2 o fragmento de unión a antígeno de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 5. Composición farmacéutica que comprende: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante de anticuerpo anti-ErbB2 o fragmento de unión a antígeno de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención o el tratamiento de un cáncer.
- 25 6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, carcinoma de células renales, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer endometrial, tumor de la glándula salivar, cáncer de colon y cáncer de tiroides.

Fig. 1

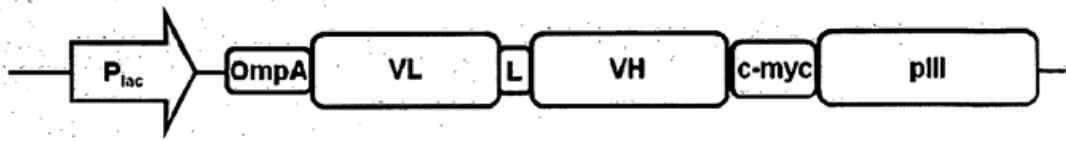


Fig. 2

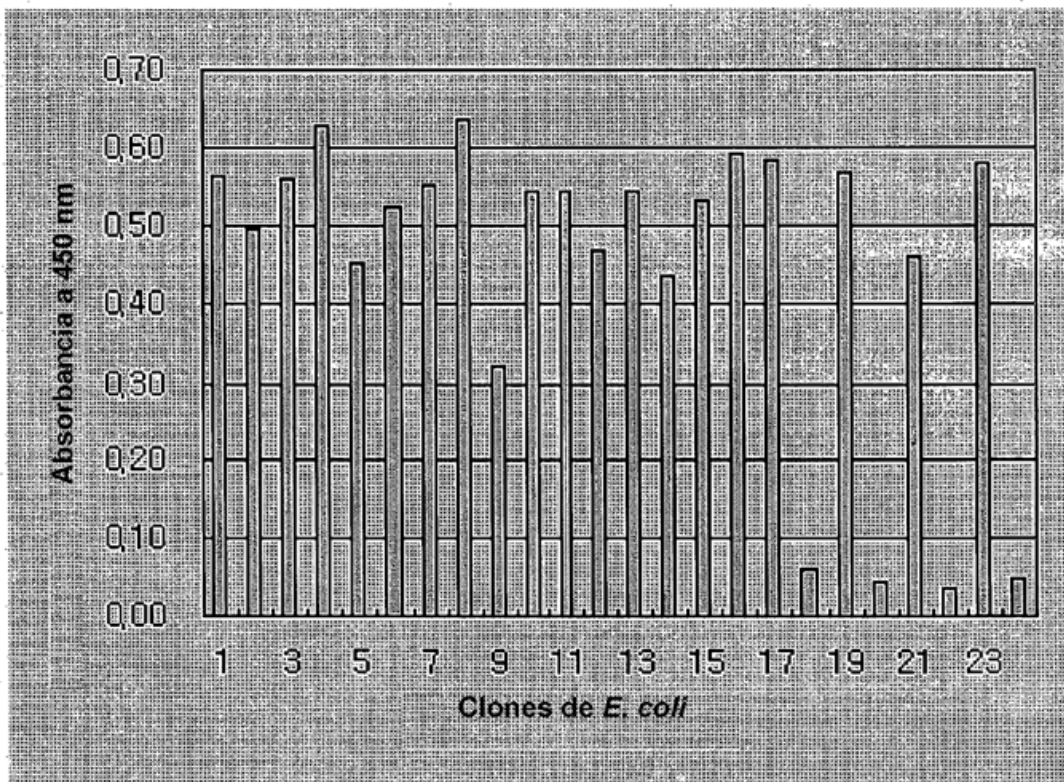


Fig. 3

SEQ.ID NO:1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTY IHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRY	60
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTY IHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRY	
SEQ.ID NO:3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTY IHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRY	60
	ADSVKGRFT I SADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS	120
	ADSVKGRFT I SADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGG GFYA WGQGLVTVSS	
	ADSVKGRFT I SADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGWGFYAFALWGQGLVTVSS	120
SEQ.ID NO:1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTY IHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRY	60
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTY IHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRY	
SEQ.ID NO:4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTY IHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRY	60
	ADSVKGRFT I SADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS	120
	ADSVKGRFT I SADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRW GFY+ +WGQGLVTVSS	
	ADSVKGRFT I SADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWNNAKGFYSFVHWGGGLVTVSS	120
SEQ.ID NO:1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTY IHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRY	60
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTY IHWVRQA GKGLEWVAR IYPTNGYTRY	
SEQ.ID NO:6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTY IHWVRQARGKGLEWVAR IYPTNGYTRY	60
	ADSVKGRFT I SADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS	120
	ADSVKGRFT I SADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGG GFYA WGQGLVTVSS	
	ADSVKGRFT I SADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGWGFYAFALWGQGLVTVSS	120

Fig. 4

SEQ.ID NO:2	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPS	60
	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPS	
SEQ.ID NO:5	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPS	60
	RFSGRRSGTDFTLTISSLQPEDFATYCCQQHYTTPTFGGQTKVEIK	107
	RFSGRRSGTDFTLTISSLQPEDFATYCCQQHY TP +FGQGTKVEIK	
	RFSGRRSGTDFTLTISSLQPEDFATYCCQQHYQTPASFGQGTKVEIK	107
SEQ.ID NO:2	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPS	60
	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIY+ ++ YSGVPS	
SEQ.ID NO:7	DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYTTTWPYSGVPS	60
	RFSGRRSGTDFTLTISSLQPEDFATYCCQQHYTTPTFGGQTKVEIK	107
	RFSGRRSGTDF+LTISSLQPEDFATYCCQQ+Y TP TFGQGTKVEIK	
	RFSGRRSGTDFSLTISSLQPEDFATYCCQQYNTPTVTFGGQTKVEIK	107

Fig. 5

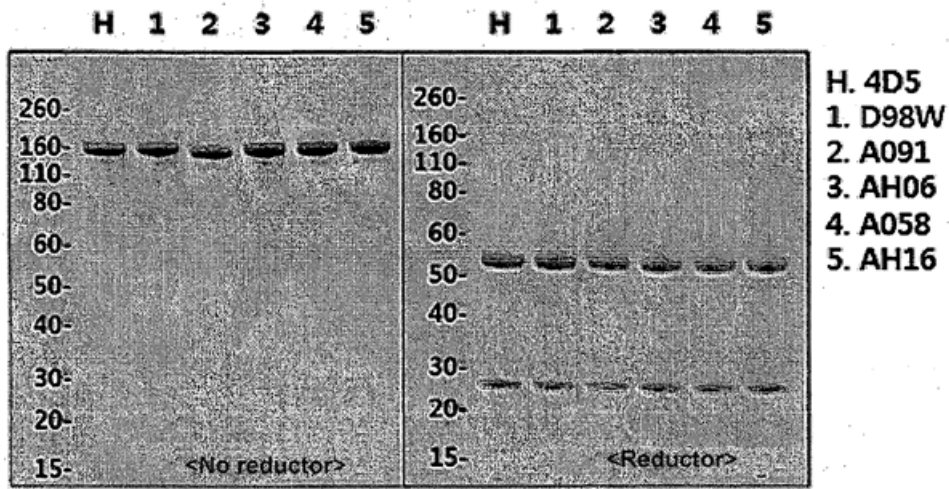


Fig. 6

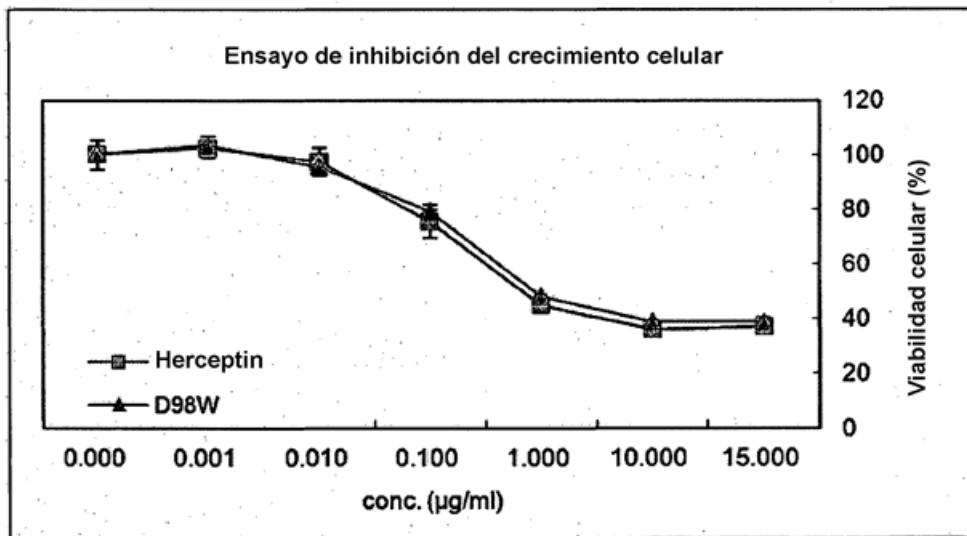


Fig. 7

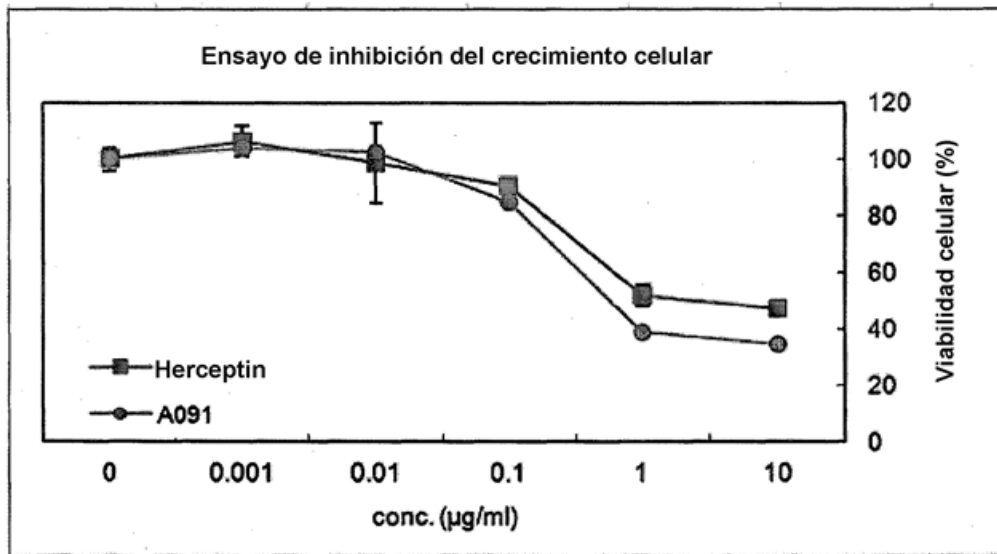
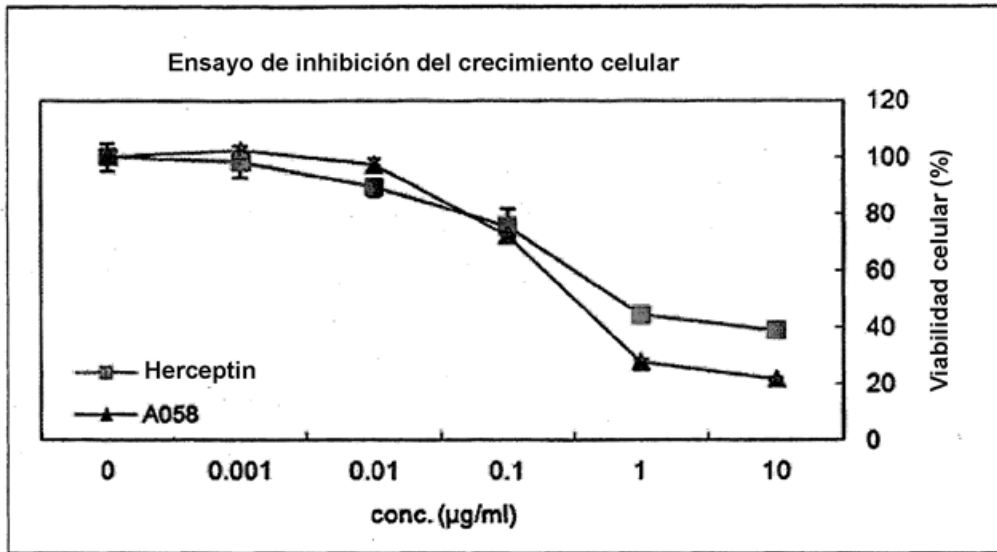


Fig. 8

