

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 952**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2007** **E 12154574 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017** **EP 2511301**

54 Título: **Anticuerpos humanos contra ERBB2**

30 Prioridad:

04.08.2006 US 835514 P

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

04.04.2018

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building Granta Park
Cambridge, Cambridgeshire CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**CARTLIDGE, SUSAN ANN;
DONG, JIANYING;
HICKINSON, MARK;
KANG, JASPAL SINGH y
FOLTZ, IAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 661 952 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 humanos contra ERBB2

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad bajo la Sección 119 del título 35 del U.S.C. a la solicitud provisional de EE.UU. N.º de serie 60/835.514, presentada el 4 de agosto de 2006.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-ErbB2, particularmente a anticuerpos humanos, y métodos de preparación y uso de anticuerpos anti-ErbB2, por ejemplo para tratar cáncer.

15 Antecedentes de la invención

La familia ErbB de tirosina cinasas de receptor son importantes mediadores del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia de receptores incluye cuatro miembros distintos que incluyen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o ErbB1), HER2 (ErbB2 o p185neu), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4).

20 EGFR, codificado por el gen erbB1, se ha implicado causalmente en tumor maligno humano. En particular, se ha observado elevada expresión de EGFR en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y de estómago, además de glioblastomas. La elevada expresión del receptor EGFR está frecuentemente asociada a la elevada producción del ligando de EGFR, factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), por las mismas células tumorales que producen la activación del receptor por una vía estimuladora autocrina (Baselga y Mendelsohn, *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994)). Se han evaluado anticuerpos monoclonales dirigidos contra EGFR o sus ligandos, TGF- α y EGF, como agentes terapéuticos en el tratamiento de tales tumores malignos. Véanse, por ejemplo, Baselga y Mendelsohn, arriba; Masui et al. *Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); y Wu et al. *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995).

30 El segundo miembro de la familia ErbB, p185neu, se identificó originalmente como el producto del gen transformante de neuroblastomas de ratas químicamente tratadas. La forma activada del proto-oncogén neu resulta de una mutación puntual (valina a ácido glutámico) en la región transmembranaria de la proteína codificada. Se observa amplificación del homólogo humano de neu en cánceres de mama y de ovario y se correlaciona con un mal pronóstico (Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989); y la patente de EE.UU. N.º 4.968.603). Hasta la fecha, no se ha informado de mutación puntual análoga a aquella en el proto-oncogén neu para tumores humanos. También se ha observado expresión en exceso de ErbB2 (frecuentemente pero no uniformemente debida a amplificación génica) en otros carcinomas que incluyen carcinomas del estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. Véanse, entre otros, King et al., *Science*, 229:974 (1985); Yokota et al., *Lancet*: 1:765-767 (1986); Fukushige et al., *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Guerin et al., *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen et al., *Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura et al., *Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst et al., *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner et al., *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern et al., *Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park et al., *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau et al., *Mol. Carcinog.*, 3:254-257 (1990); Aasland et al. *Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988); Williams et al. *Pathobiology* 59:46-52 (1991); y McCann et al., *Cancer*, 65:88-92 (1990).

ErbB2 puede expresarse en exceso en cáncer de próstata (Gu et al. *Cancer Lett.* 99:185-9 (1996); Ross et al. *Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997); Ross et al. *Cancer* 79:2162-70 (1997); y Sadasivan et al. *J. Urol.* 150:126-31 (1993)).

50 Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos de proteína p185neu de rata y ErbB2 humana. Drebin y colaboradores han producido anticuerpos contra el producto génico neu de rata, p185neu. Véanse, por ejemplo, Drebin et al., *Cell* 41:695-706 (1985); Myers et al., *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); y el documento WO94/22478. Drebin et al. *Oncogene* 2:273-277 (1988) informa de que mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones distintas de p185neu producen efectos antitumorales sinérgicos sobre células NIH-3T3 transformadas con neu implantadas en ratones sin pelo. Véase también la patente de EE.UU. N.º 5.824.311 concedida el 20 de octubre de 1998.

60 Hudziak et al., *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989) describen la generación de un panel de anticuerpos anti-ErbB2 que se caracterizaron usando la línea celular de tumor de mama humano SK-BR-3. Se determinó proliferación celular relativa de las células SK-BR-3 tras la exposición a los anticuerpos por tinción con cristal violeta de las monocapas después de 72 horas. Usando este ensayo, se obtuvo inhibición máxima con el anticuerpo llamado 4D5 que inhibió la proliferación celular el 56 %. Otros anticuerpos en el panel redujeron la proliferación celular a un menor grado en este ensayo. Se encontró además que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba líneas celulares de tumor de mama que expresaban en exceso ErbB2 a los efectos citotóxicos de TNF- α . Véase también la patente de EE.UU. N.º 5.677.171 concedida el 14 de octubre de 1997. Los anticuerpos anti-ErbB2 tratados en Hudziak et al. se caracterizan además en Fendly et al. *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts et al. *In vitro* 26(3):59A (1990); Sarup et al.

Growth Regulation 1:72-82 (1991); Shepard et al. J. Clin. Immunol. 11(3):117-127 (1991); Kumar et al. Mol. Cell. Biol. 11 (2):979-986 (1991); Lewis et al. Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263 (1993); Pietras et al. Oncogene 9:1829-1838 (1994); Vitetta et al. Cancer Research 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski et al. J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665 (1994); Scott et al. J. Biol. Chem. 266:14300-5 (1991); D'souza et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7202-7206 (1994); Lewis et al. Cancer Research 56:1457-1465 (1996); y Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997).

Una versión humanizada recombinante del anticuerpo anti-ErbB2 murino 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2 o HERCEPTIN®; patente de EE.UU. N.º 5.821.337) está clínicamente activa en pacientes con cánceres de mama metastásico que expresan en exceso ErbB2 que han recibido una amplia terapia contra el cáncer previa (Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14:737-744 (1996)). HERCEPTIN® recibió la autorización de venta de la Agencia Estadounidense del Medicamento el 25 de septiembre de 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores expresan en exceso la proteína ErbB2.

Otros anticuerpos anti-ErbB2 con diversas propiedades se han descrito en Tagliabue et al. Int. J. Cancer 47:933-937 (1991); McKenzie et al. Oncogene 4:543-548 (1989); Maier et al. Cancer Res. 51:5361-5369 (1991); Bacus et al. Molecular Carcinogenesis 3:350-362 (1990); Stancovski et al. PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991); Bacus et al. Cancer Research 52:2580-2589 (1992); Xu et al. Int. J. Cancer 53:401-408 (1993); documento WO94/00136; Kasprzyk et al. Cancer Research 52:2771-2776 (1992); Hancock et al. Cancer Res. 51:4575-4580 (1991); Shawver et al. Cancer Res. 54:1367-1373 (1994); Arteaga et al. Cancer Res. 54:3758-3765 (1994); Harwerth et al. J. Biol. Chem. 267:15160-15167 (1992); patente de EE.UU. N.º 5.783.186; y Klapper et al. Oncogene 14:2099-2109 (1997).

El cribado de homología ha producido la identificación de otros dos miembros de la familia del receptor de ErbB; ErbB3 (patentes de EE.UU. N.º 5.183.884 y 5.480.968, además de Kraus et al. PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989)) y ErbB4 (solicitud de patente EP N.º 599.274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993); y Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993)). Ambos de estos receptores muestran elevada expresión en al menos algunas líneas de células de cáncer de mama.

Los receptores de ErbB se encuentran generalmente en diversas combinaciones en células y se cree que la heterodimerización aumenta la diversidad de respuestas celulares a una variedad de ligandos de ErbB (Earp et al. Breast Cancer Research and Treatment 35: 115-132 (1995)). EGFR se une por al menos seis ligandos diferentes; factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), anfíregulina, factor de crecimiento epidérmico que se une a heparina (HB-EGF), betacelulina y epiregulina (Groenen et al. Growth Factors 11:235-257 (1994)). Una familia de proteínas heregulina resultantes de corte y empalme alternativo de un único gen son ligandos para ErbB3 y ErbB4. La familia heregulina incluye heregulinas alfa, beta y gamma (Holmes et al., Science, 256:1205-1210(1992); patente de EE.UU. N.º 5.641.869; y Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)); factores de diferenciación neu (NDFs), factores de crecimiento de la glía (GGFs); actividad inductora de receptor de acetilcolina (ARIA); y factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF). Para una revisión, véase Groenen et al. Growth Factors 11:235-257 (1994); Lemke, G. Molec. & Cell. Neurosci. 7:247-262 (1996) y Lee et al. Pharm. Rev. 47:51-85 (1995). Recientemente se identificaron tres ligandos de ErbB adicionales; neuregulina-2 (NRG-2) que se informa que se une tanto a ErbB3 como a ErbB4 (Chang et al. Nature 387 509-512 (1997); y Carraway et al. Nature 387:512-516 (1997)); neuregulina-3 que se une a ErbB4 (Zhang et al. PNAS (USA) 94(18):9562-7 (1997)); y neuregulina-4 que se une a ErbB4 (Harari et al. Oncogene 18:2681-89 (1999)). HB-EGF, betacelulina y epiregulina también se unen a ErbB4. Mientras que EGF y TGF α no se unen a ErbB2, EGF estimula EGFR y ErbB2 para formar un heterodímero, que activa EGFR y produce transfosforilación de ErbB2 en el heterodímero. Parece que la dimerización y/o transfosforilación activan la tirosina cinasa de ErbB2. Véase Earp et al., arriba. Asimismo, cuando ErbB3 se co-expresa con ErbB2, se forma un complejo de señalización activo y los anticuerpos dirigidos contra ErbB2 son capaces de alterar este complejo (Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994)). Adicionalmente, la afinidad de ErbB3 por heregulina (HRG) aumenta hasta un estado de afinidad más alto cuando se co-expresa con ErbB2. Véase, por tanto, Levi et al., Journal of Neuroscience 15: 1329-1340 (1995); Morrissey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1431-1435 (1995); y Lewis et al., Cancer Res., 56:1457-1465 (1996) con respecto al complejo de proteínas ErbB2-ErbB3. ErbB4, al igual que ErbB3, forma un complejo de señalización activa con ErbB2 (Carraway y Cantley, Cell 78:5-8 (1994)).

El producto del proto-oncogén HER-2/neu, HER2, es el segundo miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (HER) humano de receptores de tirosina cinasa y se ha sugerido que es un receptor de orfano de ligando. La heterodimerización dependiente de ligando entre HER2 y otro miembro de la familia de HER, HER1, HER3 o HER4, activa la vía de señalización de HER2. Se cree que la vía de señalización intracelular de HER2 implica a las vías ras-MAPK y PI3K, además de a las vías de señalización de cinasa S6 independiente de MAPK y fosfolipasa C-gamma (Graus-Porta et al., Mol Cell Biol. 1995 March; 15(3): 1182-1191; Grant et al., Front Biosci. 2002 Feb 1;7:d376-89).

La señalización de HER2 también afecta a los factores proangiogénicos, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e interleucina-8 (IL-8), y un factor antiangiogénico, trombospondina-1 (TSP-1). La re-expresión de HER2 en células de cáncer de mama MCF-7 y T-47D que expresan endógenamente niveles bajos de HER2 produce elevada

expresión de VEGF y IL-8 y disminución de la expresión de TSP-1. La inhibición de HER2 con un anticuerpo anti-HER2 humanizado (trastuzumab, o Herceptin®) o un ARN interferente pequeño mediado por retrovirus contra HER2 (siHER2) disminuye la expresión de VEGF e IL-8, pero aumenta la expresión de TSP-1 en células de cáncer de mama BT474 que expresan altos niveles de HER2. La señalización de HER2, por tanto, influye en el equilibrio entre factores pro- y antiangiogénicos mediante distintas vías de señalización. Trastuzumab inhibe la angiogénesis y el crecimiento tumoral, al menos en parte, mediante la activación de la vía HER2-p38-TSP-1 y la inhibición de la vía HER2-PI3K-AKT-VEGF/IL-8 (Wen et al., Oncogene. 2006 May 22; Epub). Adicionalmente, RTK de membrana de ErbB2 puede conferir resistencia a la apoptosis inducida por taxol fosforilando directamente Cdc2 (Tan et al., Mol Cell. 2002 May;9 (5):993-1004).

El documento WO 03/006509 A desvela la producción y los usos médicos de un scFv anti-ErbB2 humano, que neutralizó la activación de ErbB2 e inhibió la fosforilación.

Sumario de la invención

La invención proporciona un anticuerpo humano aislado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se une específicamente a ErbB2, e inhibe la fosforilación de ErbB2 en células MCF7 con una CE₅₀ inferior a 50 ng/ml, en la que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, en el que las tres CDRs de cadena pesada y las tres CDRs de cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste en:

(a) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 8;

(b) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 14, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 16;

(c) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 18, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 20;

(d) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 22, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 24;

(e) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 26, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 28;

(f) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 30, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 32;

(g) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 34, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 36; o

(h) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 38, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 40,

en el que las CDRs son como se definen por Kabat y en el que dichas regiones CDR tienen menos de tres sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de tres o menos sustituciones de aminoácidos no conservativas, en el que cada sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en (i) sustitución de un residuo que no es de la línea germinal con un residuo de la línea germinal; (ii) sustitución para eliminar pares de asparagina-glicina; (iii) sustitución para eliminar una cisteína no emparejada; (iv) sustitución de un residuo de la línea germinal con un residuo que no es de la línea germinal y (v) sustitución conservativa.

También se proporciona en el presente documento una composición que comprende un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, según la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, según la invención.

También se proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la invención, en la que el vector opcionalmente comprende una secuencia de control de la expresión operativamente unida a la molécula de ácido nucleico.

Todavía además, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende un vector de la invención.

También se proporciona un método de producción de un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende cultivar una célula hospedadora de la invención bajo condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo.

5 Adicionalmente, la invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, según la invención, o una composición según la invención, para su uso en el tratamiento de cáncer. En tal uso de la invención, el cáncer puede ser seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello, próstata, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreático, y glioblastomas.

10 La invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, según la invención, o una composición según la invención para su uso en la inhibición de la proliferación de una célula cancerosa que expresa ErbB2.

15 También se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, según la invención, o una composición según la invención para su uso en la inhibición de una actividad de ErbB2 en una célula que expresa ErbB2, donde la actividad de ErbB2 en la célula se selecciona del grupo que consiste en:

- 20 (a) fosforilación de ErbB2;
- (b) activación de la vía MAPK;
- (c) activación de la vía PI3K;
- (d) inhibición de CDC2 y
- (e) combinaciones de las mismas.

25 En el presente documento se describe un agente de unión dirigido, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano o una porción de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a ErbB2. El agente de unión dirigido puede poseer al menos una de las siguientes propiedades:

- 30 (a) se une a células humanas;
- (b) se une a células que expresa ErbB2 de cinomolgo;
- (c) compite parcialmente con Herceptin® pero no compite con 2C4;
- (d) inhibe la fosforilación de ErbB2 en células MCF7 con una CE50 inferior a 50 ng/ml;
- (e) inhibe la proliferación celular con una CE50 inferior a 50 ng/ml en células SKBR3;
- 35 (f) se une a ErbB2 con una KD de 13,5 nM o menos; o
- (g) tiene una velocidad de disociación (kdis) para ErbB2 de $2,14 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o más pequeña.

El agente de unión dirigido puede unir ErbB2 con una KD de 13,5 nM o menos y puede inhibir la activación de ErbB. Un agente de unión dirigido es un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo monoclonal humanizado, quimérico o humano o porción de unión al antígeno del mismo.

40 En el presente documento se describe un agente de unión dirigido, por ejemplo un anticuerpo monoclonal humanizado, quimérico o humano o porción de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a e inhibe ErbB2 humana, en el que el agente de unión dirigido puede tener al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en:

- 45 (a) compite para unirse a ErbB2 con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3;
- 50 (b) compite para unirse a ErbB2 con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3;
- (c) se une al mismo epítotope de ErbB2 que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3;
- 55 (d) se une a ErbB2 con sustancialmente la misma KD que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3;
- (e) se une a ErbB2 con sustancialmente la misma velocidad de disociación que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3.
- 60

En el presente documento se describe un agente de unión dirigido, por ejemplo un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a ErbB2, en el que:

(a) el agente de unión dirigido comprende la secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3;

(b) el agente de unión dirigido comprende la secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3; y

(c) el agente de unión dirigido comprende una cadena pesada de (a) y una cadena ligera de (b); o el agente de unión dirigido de (c) en el que las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada y cadena ligera están seleccionadas del mismo anticuerpo.

El agente de unión dirigido puede ser un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humanizado, quimérico o humano o porción de unión al antígeno del mismo. El anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo puede incluir además la secuencia de aminoácidos de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 46, la secuencia de aminoácidos de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 47, o ambas.

El anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo puede ser de cualquier isotipo.

El anticuerpo monoclonal humano o porción de unión al antígeno del mismo puede incluir una cadena pesada que utiliza un gen VH 3-21 humano, un gen VH 3-7 humano, un gen VH 4-31 humano o un gen VH 3-13 humano.

El anticuerpo monoclonal humano o porción de unión al antígeno del mismo de la invención puede incluir una cadena pesada que utiliza un gen VH 3-21 humano, un gen VH 3-7 humano, un gen VH 4-31 humano o un gen VH 3-13 humano.

El anticuerpo monoclonal humano o porción de unión al antígeno del mismo de la invención puede incluir una cadena ligera que utiliza un gen B3 de VK humano, un gen L1 de VK humano, un gen A2 de VK humano o un gen A1 de VK humano.

El anticuerpo monoclonal humano o porción de unión al antígeno del mismo de la invención puede incluir una cadena ligera que utiliza un gen B3 de VK humano, un gen L1 de VK humano, un gen A2 de VK humano o un gen A1 de VK humano.

El dominio VL, el dominio VH, o ambos del anticuerpo monoclonal humano o porción de unión al antígeno del mismo, puede ser al menos 90 % idénticos en secuencia de aminoácidos al dominio VL, dominio VH o ambos, respectivamente, de los anticuerpos monoclonales 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3.

También se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a ErbB2, en el que el anticuerpo comprende uno o más de una secuencia de aminoácidos de FR1, FR2, FR3 o FR4 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3.

También se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal humano o una porción de unión al antígeno, en el que el anticuerpo incluye

(a) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo monoclonal 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3;

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo monoclonal 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3; o ambas (a) y (b).

Un anticuerpo monoclonal humano o una porción de unión al antígeno descritos en el presente documento puede seleccionarse del grupo que consiste en: Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, y fragmentos de región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv o scFv₂), anticuerpos quiméricos, diacuerpos, anticuerpos diespecíficos, y polipéptidos que contienen al menos una porción de un anticuerpo que es suficiente para conferir unión al antígeno específica al polipéptido

En el presente documento se describe una composición que comprende el agente de unión dirigido, por ejemplo un anticuerpo o porción de unión al antígeno descritos en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede incluir además un agente terapéutico o de diagnóstico adicional. La composición puede incluir además un segundo anticuerpo que se une específicamente a ErbB2 en la que dicho segundo anticuerpo no compite para unirse a ErbB2 con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: 1.14.1, 1.18.1, 1.20.1, 1.24.3, 1.39.1, 1.71.3, 1.96.2, 1.100.1 y 1.140.1.

En el presente documento se describe una línea celular aislada que produce el agente de unión dirigido, anticuerpo o porción de unión al antígeno descritos en el presente documento o la cadena pesada o cadena ligera de dicho anticuerpo o dicha porción.

- 5 En el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión al antígeno del mismo, la cadena ligera o una porción de unión al antígeno del mismo, o ambas. El ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 10 (a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1;
 (b) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:2;
 (c) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3;
 (d) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:4;
 (e) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:5;
 15 (f) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:6;
 (g) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:7;
 (h) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:8;
 (i) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:9;
 (j) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:10;
 20 (k) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:11;
 (l) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:12;
 (m) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:13;
 (n) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:14;
 (o) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:15;
 25 (p) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:16;
 (q) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:17;
 (r) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:18;
 (s) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:19;
 (t) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:20;
 30 (u) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:21;
 (v) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:22;
 (w) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:23;
 (x) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:24;
 (y) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:25;
 35 (z) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:26;
 (aa) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:27;
 (bb) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:28;
 (cc) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:29;
 (dd) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:30;
 40 (ee) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:31;
 (ff) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:32;
 (gg) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:33;
 (hh) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:34;
 (ii) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:35;
 45 (jj) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:36;
 (kk) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:37;
 (ll) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:38;
 (mm) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:39;
 (nn) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:40;
 50 (oo) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:41;
 (pp) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:42;
 (qq) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:43; y
 (rr) la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:44.
- 55 En el presente documento se describe un vector que comprende la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, en el que el vector opcionalmente comprende una secuencia de control de la expresión operativamente unida a la molécula de ácido nucleico. También se describe una célula hospedadora que comprende el vector o la molécula de ácido nucleico descritos en el presente documento.
- 60 En el presente documento se describe un método de producción del agente de unión dirigido, anticuerpo monoclonal o porción de unión al antígeno descritos en el presente documento, que comprende las etapas de cultivar la célula hospedadora o la línea celular descritas en el presente documento bajo condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo o porción de unión al antígeno.
- 65 En el presente documento se describe un animal transgénico no humano o planta transgénica que comprende el ácido nucleico descrito en el presente documento, en el que el animal transgénico no humano o planta transgénica

expresa dicho ácido nucleico. En el presente documento se describe un método de aislamiento de un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a ErbB2 humana. El método incluye la etapa de aislar el anticuerpo del animal transgénico no humano o planta transgénica.

5 En el presente documento se describe un método de preparación de un anticuerpo monoclonal humano que se une específicamente a ErbB2, que comprende las etapas de:

- (i) inmunizar un animal transgénico no humano que es capaz de producir anticuerpos humanos con ErbB2, una porción inmunogénica de ErbB2 en una célula o tejido que expresa ErbB2;
- 10 (ii) permitir que el animal transgénico genere una respuesta inmunitaria a ErbB2; y
- (iii) recuperar el anticuerpo.

También se describe en el presente documento un método de tratamiento, prevención o alivio de los síntomas de un trastorno mediado por ErbB2 en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto un agente de unión dirigido, un anticuerpo o porción de unión al antígeno o la composición descrita en el presente documento, en el que dicho agente de unión dirigido, anticuerpo o porción de unión al antígeno inhibe ErbB2.

20 En otro aspecto más, se describe en el presente documento un método de tratamiento, prevención o alivio de los síntomas de un trastorno mediado por ErbB2 tal como cáncer en un sujeto en necesidad del mismo con un agente de unión dirigido, por ejemplo un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a ErbB2 que comprende las etapas de:

- (i) administrar una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o la porción de unión al antígeno del mismo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el agente de unión dirigido, por ejemplo la cadena ligera o la porción de unión al antígeno de la misma, o ambos, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y la cadena pesada o porciones de unión al antígeno de las mismas de un anticuerpo; y,
- (ii) expresar la molécula de ácido nucleico.

30 Un trastorno mediado por ErbB2 puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello, próstata, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreático y glioblastomas

35 Un aspecto de la divulgación incluye un método de inhibición de la proliferación de una célula cancerosa que expresa ErbB2 en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método la etapa de administrar a dicho sujeto un agente de unión dirigido como se describe en el presente documento, por ejemplo un anticuerpo o porción de unión al antígeno o la composición descrita en el presente documento, en el que dicho agente de unión dirigido inhibe ErbB2. En otro aspecto, dicho agente de unión dirigido es un anticuerpo.

40 Un anticuerpo como se describe en el presente documento puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado, quimérico o humano o porción de unión al antígeno del mismo.

45 Un aspecto de la divulgación incluye un método de inhibición de una actividad de ErbB2 en una célula, por ejemplo, de un sujeto o célula cancerosa, que expresa ErbB2, que comprende poner en contacto la célula con un agente de unión dirigido o con la composición descrita en el presente documento, en el que la actividad de ErbB2 en la célula está seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) fosforilación de ErbB2;
- (b) activación de la vía MAPK;
- (c) activación de la vía PI3K;
- (d) inhibición de CDC2; y
- (e) combinaciones de las mismas.

55 La fosforilación de ErbB2 puede inhibirse 48 horas.

60 Un aspecto de la divulgación incluye un método de modulación de una actividad de ErbB2 en una célula que expresa ErbB2, que incluye poner en contacto la célula con un anticuerpo o porción de unión al antígeno o con la composición descrita en el presente documento en el que la actividad de ErbB2 en la célula es activación de la vía p38-TSP-1.

65 Un sitio de unión al antígeno puede comprender una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3 con nada menos que veinte, dieciséis, diez, nueve o menos, por ejemplo uno, dos, tres, cuatro o cinco, adiciones, sustituciones,

deleciones y/o inserciones de aminoácidos dentro de las CDRs desveladas. Tales modificaciones pueden hacerse posiblemente en cualquier resto dentro de las CDRs.

5 El agente de unión dirigido o anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una cualquiera, dos, tres, cuatro, cinco o seis de las secuencias de CDR1, CDR2 o CDR3 como se muestra en la Tabla 4, 4(a) y/o Tabla 5. El agente de unión dirigido o anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en la Tabla 4 y/o 4(a). El agente de unión dirigido o anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en la Tabla 5. El agente de unión dirigido o anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en la Tabla 4 o 3(a) y una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en la Tabla 5. Se observa que aquellos expertos habituales en la materia pueden realizar fácilmente determinaciones de CDR. Véase, por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3, o como se define en el presente documento.

15 El agente de unión dirigido o anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una cualquiera, dos, tres, cuatro, cinco o seis de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de una cualquiera de los anticuerpos monoclonales completamente humanos 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3, como se muestra en la Tabla 4, 4(a) o en la Tabla 5. El agente de unión dirigido o anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo monoclonal completamente humano 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3 como se muestra en la Tabla 4 y 4(a). El agente de unión dirigido o anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo monoclonal completamente humano 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3, como se muestra en la Tabla 5. El agente de unión dirigido o anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo monoclonal completamente humano 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3 como se muestra en la Tabla 4 y 4(a), y una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo monoclonal completamente humano 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3 como se muestra en la Tabla 5.

Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 es un gráfico que representa la correlación de los efectos de 152 sobrenadantes de hibridomas sobre la fosforilación de ErbB2 inducida por heregulina en células MCF7 después de 1 h (eje Y) y 24 h (eje X) pre-incubación.

La Figura 2 un gráfico de datos del análisis por ELISA de LA/HA. El eje Y indica la señal de unión en valor de DO cuando 31 ng/ml de hErbB2 (ECD)/cMyc-His se recubrieron sobre placa de ELISA. El eje X indica la concentración de anticuerpos específicos para ErbB2 en sobrenadantes de hibridoma derivados de ELISA de HA cuando 10 µg/ml de ErbB2 (ECD)/cMyc-His se recubrieron sobre la placa de ELISA.

40 Las Figuras 3A-3C muestran curvas de respuesta a dosis para 10 anticuerpos monoclonales anti-ErbB2 (B y C) y anticuerpos de control (A) en la fosforilación de ErbB2 inducida por heregulina en células MCF7.

Las Figuras 4A-4C muestran curvas de respuesta a dosis para 10 anticuerpos monoclonales anti-ErbB2 (B y C) y anticuerpos de control (A) en la proliferación inducida por heregulina de células MCF7.

45 Las Figuras 5A y 5B muestran curvas de respuesta a dosis para 8 anticuerpos monoclonales anti-ErbB2 (B) y anticuerpos de control (A) en un ensayo de proliferación de células BT474.

Las Figuras 6A y 6B muestran curvas de respuesta a dosis para 8 anticuerpos monoclonales anti-ErbB2 (B) y anticuerpos de control (A) en un ensayo de proliferación de células SKBR3.

50 Las Figuras 7A-7C muestran la respuesta dependiente de la dosis de la fosforilación de ErbB2 total al mAb 1.18.1 (A), Herceptin® (B) y 2C4 (C) después de incubar las células con mAbs durante 24, 48, 72 o 96 horas.

Las Figuras 8A-8C muestran la respuesta dependiente de la dosis de la fosforilación de ErbB2 normalizada al mAb 1.18.1 (A), Herceptin® (B) y 2C4 (C) después de incubar las células con mAbs durante 24, 48, 72 o 96 horas.

55 Las Figuras 9A y 9B muestran los resultados de la agrupación por competición indicando que los anticuerpos probados no compiten con 2C4 (B) o Herceptin® (A) por la unión a ErbB2 en un ELISA.

Descripción detallada de la invención

Definiciones y técnicas generales

60 A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados a propósito de la presente descripción deben tener los significados que son comúnmente entendidos por aquellos expertos habituales en la materia. Además, a menos que se requiera de otro modo por el contexto, términos en singular deben incluir pluralidades y términos en plural deben incluir el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas a propósito de, y técnicas de, cultivo de células y de tejido, biología molecular, inmunología, microbiología,

genética y química e hibridación de proteínas y de ácidos nucleicos descritos en el presente documento son aquellas muy conocidas y comúnmente usadas en la materia.

5 Los métodos y técnicas descritos en el presente documento se realizan generalmente según métodos convencionales muy conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y tratan en toda la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según especificaciones del fabricante, como comúnmente se realiza en la materia o como se describe en el presente documento. La nomenclatura usada a propósito de, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica descritos en el presente documento son aquellos muy conocidos y comúnmente usados en la materia. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de sujetos.

20 A cada anticuerpo se le ha dado un número de identificación que incluye dos o tres números cualesquiera separados por uno o dos puntos decimales. En algunos casos, se prepararon varios clones de un anticuerpo. Varios clones tienen diferentes números de identificación, aunque tienen las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos idénticas a la secuencia de origen, también pueden enumerarse por separado. Así, por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos para:

25 1.44.1=1.44.2=1.44.3=1.44;
1.124=1.148=1.140=1.140.1;
1.41=1.43=143.1=143.2=1.22.1;
1.14.1=1.14.2=1.14.3=1.14;
1.100.1=1.100.2=1.100.3=1.100;
1.107=1.104=1.128=1.96=1.99=1.96.2;
30 1.18.1=1.18.2=1.18.3=1.18;
1.20=1.19=1.20.1;
1.39=1.39.1=1.39.2=1.39.3;
1.24=1.22.2=1.71.1=1.24.3;
1.71.2=1.71.3;

35 son idénticas.

Debe entenderse que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

40 El término "polipéptido" engloba proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos de polipéptidos de una secuencia de proteínas. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

45 El término "proteína aislada", "polipéptido aislado" o "anticuerpo aislado" es una proteína, polipéptido o anticuerpo que, en virtud de su origen o fuente de derivación, (1) no está asociado a componentes naturalmente asociados que la acompañan en su estado nativo, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza. Así, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente estará "aislado" de sus componentes naturalmente asociados. Una proteína también puede convertirse en sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados por aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas muy conocidas en la técnica.

50 Ejemplos de anticuerpos aislados incluyen un anticuerpo anti-ErbB2 que ha sido purificado por afinidad usando ErbB2, un anticuerpo anti-ErbB2 que ha sido sintetizado por un hibridoma u otra línea celular *in vitro*, y un anticuerpo anti-ErbB2 humano derivado de un ratón transgénico. Los agentes de unión elegidos como diana también pueden purificarse usando técnicas similares descritas en el presente documento.

55 El término "fragmento de polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una delección del extremo amino y/o del extremo carboxi, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia que existe de forma natural. En algunos casos, los fragmentos tienen al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud. En otros casos, los fragmentos tienen al menos 60 14, al menos 20, al menos 50, o al menos 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud.

El término "modular", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cantidad de inhibición o activación de una vía.

65 Las sustituciones de aminoácidos a un anticuerpo anti-ErbB2 o porción de unión al antígeno del mismo pueden ser aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran

la afinidad de unión para formar complejos de proteína, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos, pero todavía retienen la unión específica a ErbB2. Los análogos pueden incluir diversas mutéínas de una secuencia distinta de la secuencia de péptidos que se produce normalmente. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones únicas o múltiples de aminoácidos, preferentemente sustituciones de aminoácidos conservativas, en la secuencia que se produce normalmente, preferentemente en la porción del polipéptido fuera del (de los) dominio(s) que forman los contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácidos conservativa no debe sustancialmente cambiar las características estructurales de la secuencia de origen; por ejemplo, una sustitución de aminoácido no debe alterar la hoja β antiparalela que constituye el dominio de unión de inmunoglobulina que se produce en la secuencia de origen, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia de origen. En general, la glicina y prolina no se usarían en una hoja β antiparalela. Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptido reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton et al., *Nature* 354:105 (1991).

Se usan comúnmente análogos no de péptido en la industria farmacéutica como fármacos con propiedades análogas a aquellas del péptido molde. Estos tipos de compuesto no de péptido se llaman "miméticos de péptido" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber and Freidinger, *TINS* p.392 (1985); and Evans et al., *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987). Tales compuestos se desarrollan frecuentemente con la ayuda de modelado molecular computerizado. Los miméticos de péptido que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica deseadas), tal como un anticuerpo humano, pero tiene uno o más enlaces peptídicos opcionalmente sustituidos con un enlace seleccionado del grupo que consiste en: --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂--, --CH=CH--(cis y trans), --COCH₂--, --CH(OH)CH₂-- y -CH₂SO--, por métodos muy conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) también puede usarse para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse péptidos limitados que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica por métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992); por ejemplo, añadiendo restos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido).

Donde un "anticuerpo" se refiere en el presente documento, normalmente se entiende que una porción de unión al antígeno del mismo también puede usarse. Una porción de unión al antígeno compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. Véase generalmente *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Pueden producirse porciones de unión al antígeno por técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Porciones de unión al antígeno incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb y fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv o scFv₂), anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de un anticuerpo que es suficiente para conferir unión de antígeno específica al polipéptido.

De extremo N a extremo C, tanto los dominios variables de cadena ligera como pesada maduros comprenden las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio en el presente documento es según las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) o Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989).

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que se refiere por número es el mismo que un anticuerpo monoclonal que se obtiene del hibridoma del mismo número. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 1.18 es el mismo anticuerpo que uno obtenido del hibridoma 1*18, o un subclon del mismo. Los subclones se identifican con otro decimal, por ejemplo 1.18.1.

Como se usa en el presente documento, un fragmento Fd significa un fragmento de anticuerpo que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv consiste en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo; y un fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)) consiste en un dominio VH.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monocatenario (scFv) en el que un dominio VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes mediante un conector sintético que les permite prepararse como una cadena de proteína única (Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988) y Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)). Los anticuerpos pueden ser diacuerpos, es decir, anticuerpos bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan en una cadena de polipéptidos única, pero usando un conector que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), y Poljak R. J. et al., *Structure* 2:1121-1123 (1994).) Una o más CDRs de un anticuerpo descrito en el presente documento pueden incorporarse en una molécula tanto covalentemente como no covalentemente para hacerla una inmunoadhesina que se une específicamente a ErbB2.

La(s) CDR(s) puede(n) incorporarse como parte de una cadena de polipéptidos mayor, puede(n) unirse covalentemente a otra cadena de polipéptidos, o puede(n) incorporarse no covalentemente.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo humano" significa cualquier anticuerpo en el que las secuencias de dominio variable y constante son secuencias humanas. El término engloba anticuerpos con secuencias derivadas de genes humanos, pero que han sido cambiados, por ejemplo, para reducir la posible inmunogenicidad, aumentar la afinidad, eliminar cisteínas que podrían producir plegamiento no deseable, etc. El término engloba tales anticuerpos producidos recombinantemente en células no humanas, que podrían conferir glucosilación no típica de células humanas. Estos anticuerpos pueden prepararse en una variedad de formas, como se describe a continuación.

El término "anticuerpo quimérico", como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo que comprende regiones de dos o más anticuerpos diferentes. Una o más de las CDRs del anticuerpo quimérico pueden derivar de un anticuerpo anti-ErbB2 humano, o todas las CDRs pueden derivar de un anticuerpo anti-ErbB2 humano. Las CDRs de más de un anticuerpo anti-ErbB2 humano pueden combinarse en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena ligera de un primer anticuerpo anti-ErbB2 humano, una CDR2 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo anti-ErbB2 humano y una CDR3 de la cadena ligera de un tercer anticuerpo anti-ErbB2 humano, y las CDRs de la cadena pesada pueden derivar de uno o varios de otros anticuerpos anti-ErbB2. Además, las regiones estructurales pueden derivar de uno de los anticuerpos anti-ErbB2 de los que se toman una o más de las CDRs o de uno o más anticuerpos humanos diferentes.

Un anticuerpo quimérico descrito en el presente documento puede ser un anticuerpo anti-ErbB2 humanizado. Un anticuerpo anti-ErbB2 humanizado descrito en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de una o más regiones estructurales y/o la secuencia de aminoácidos de al menos una porción de la región constante de uno o más anticuerpos anti-ErbB2 humanos descritos en el presente documento y CDRs derivadas de un anticuerpo anti-ErbB2 no humano.

Un "anticuerpo inhibidor" (también denominado en el presente documento un "anticuerpo antagonista") como se usa en el presente documento significa un anticuerpo que inhibe una o más actividades de ErbB2 al menos aproximadamente el 30 % cuando se añade a una célula, tejido o organismo que expresa ErbB2. El anticuerpo puede inhibir la actividad de ErbB2 al menos el 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o más del 100 %. El anticuerpo inhibidor puede añadirse en presencia de ligando tal como heregulina. Un anticuerpo antagonista descrito en el presente documento puede disminuir al menos un actividad de ErbB2 5 veces.

"Fragmentos de unión" de un anticuerpo se producen por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb y anticuerpos monocatenarios. Un anticuerpo distinto de un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" se entiende que tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo inhibe sustancialmente la adhesión de un receptor a un contra-receptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de receptor unida al contra-receptor al menos aproximadamente el 20 %, 40 %, 60 % o el 80 %, y más normalmente más de aproximadamente el 85 % (como se mide en un ensayo de unión competitiva *in vitro*).

Pueden prepararse fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina por aquellos expertos habituales en la materia siguiendo las enseñanzas de esta memoria descriptiva. Extremos amino y carboxi preferidos de los fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de dominios funcionales. Pueden identificarse dominios estructurales y funcionales por comparación de datos de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o patentadas. Preferentemente, se usan métodos de comparación computerizada para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de proteínas predichos que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen métodos de identificación de secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Véase Bowie et al., Science 253:164 (1991).

Se ha mostrado que fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Ejemplos de fragmentos de unión son (Ward, E.S. et al., (1989) Nature 341, 544-546) el fragmento Fab que consiste en dominios VL, VH, CL y CH1; (McCafferty et al (1990) Nature, 348, 552-554) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (Holt et al (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989), McCafferty et al (1990) Nature, 348, 552-554, Holt et al (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490], que consiste en un dominio VH o VL; (v) regiones CDRs aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas de Fv monocatenario (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL se unen por un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al, (1988) Science, 242, 423-426, Huston et al, (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883); (viii) dímeros Fv monocatenarios biespecíficos (documento PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por fusión de genes (documento WO94/13804; Holliger, P. (1993) et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448). Las moléculas Fv, scFv o de diacuerpo pueden estabilizarse por la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter, Y. et al, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996). También

pueden prepararse minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (Hu, S. et al. (1996) Cancer Res., 56, 3055-3061). Otros ejemplos de fragmentos de unión son Fab', que se diferencia de los fragmentos Fab mediante la adición de nuevos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada, que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo, y Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el que el (los) resto(s) de cisteína(s) de los dominios constantes poseen un grupo tiol libre.

Un "agente de unión dirigido inhibidor", como se usa en el presente documento, significa un agente de unión dirigido que inhibe una o más actividades de ErbB2 al menos aproximadamente el 30 % cuando se añade a una célula, tejido u organismo que expresa ErbB2. El agente de unión dirigido puede inhibir la actividad de ErbB2 al menos aproximadamente el 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o más del 100 %. El agente de unión dirigido inhibidor puede añadirse en presencia de ligando tal como heregulina. Los agentes de unión dirigidos descritos en el presente documento pueden disminuir al menos 5 veces una actividad de ErbB2.

El término "resonancia de plasmones superficiales", como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biospecíficas en tiempo real por detección de alteraciones en concentraciones de proteína dentro de una matriz biosensora, por ejemplo usando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, véase Jonsson U. et al., Ann. Biol. Clin. 51:19-26 (1993); Jonsson U. et al., Biotechniques 11:620-627 (1991); Jonsson B. et al., J. Mol. Recognit. 8:125-131 (1995); y Johnsson B. et al., Anal. Biochem. 198:268-277 (1991).

El término "KD" se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

El término "epítotope" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T o de interactuar de otro modo con una molécula. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activa tales como aminoácidos o cadenas laterales de hidrato de carbono o de azúcar y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, además de características de carga específicas. Un epítotope puede ser "lineal" o "conformacional". En un epítotope lineal, todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula de interacción (tal como un anticuerpo) se producen linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. En un epítotope conformacional, los puntos de interacción se producen a través de restos de aminoácidos en la proteína que se separan unos de otros. Un anticuerpo se dice que une específicamente un antígeno cuando la constante de disociación es ≤ 1 mM, preferentemente ≤ 100 nM y lo más preferentemente ≤ 10 nM. La KD puede ser 1 pM a 500 pM, entre 500 pM y 1 μ M, o entre 1 μ M y 100 nM. La KD puede ser entre 100 mM y 10 nM. Una vez se determina un epítotope deseado en un antígeno, es posible generar anticuerpos para ese epítotope, por ejemplo, usando las técnicas descritas en el presente documento. Alternativamente, durante el proceso de descubrimiento, la generación y caracterización de anticuerpos puede dilucidar información sobre epítotoses deseables. A partir de esta información, es entonces posible cribar competitivamente anticuerpos para unirse al mismo epítotope. Un enfoque para lograr esto es realizar estudios de competición cruzada para encontrar anticuerpos que se unen competitivamente el uno al otro, por ejemplo, los anticuerpos compiten para unirse al antígeno. Un proceso de alta resolución para "agrupar" anticuerpos basados en su competición cruzada se describe en la solicitud de patente internacional N.º WO 03/48731.

Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology - A Synthesis (2ª Edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).

El término "polinucleótido", como se refiere en el presente documento, significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, tanto ribonucleótidos como desoxinucleótidos, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas mono y bicatenarias.

El término "polinucleótido aislado", como se usa en el presente documento, significa un polinucleótido de origen genómico, de ADNc, o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen el "polinucleótido aislado" (1) no está asociado a toda o una porción de un polinucleótido con el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está operativamente unido a un polinucleótido con el que no está unido en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término "nucleótidos que existen de forma natural", como se usa en el presente documento, incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados", como se usa en el presente documento, incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces de oligonucleótido" referido en el presente documento incluye enlaces de oligonucleótidos tales como fosforotioato, fosforditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato, y similares. Véase, por ejemplo, LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford

England (1991)); patente de EE.UU. N.º 5.151.510; Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir una marca para la detección, si se desea.

5 Secuencias "operativamente unidas" incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son contiguas con el gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión", como se usa en el presente documento, significa secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que se unen. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de iniciación de la transcripción, terminación, promotoras y potenciadoras apropiadas; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; 10 secuencias que potencian la eficiencia de traducción (es decir, secuencia consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de proteínas; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control se diferencia dependiendo del organismo hospedador; en procariontes, tales secuencias de control generalmente incluyen promotor, sitio de unión al ribosoma y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotes, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias conductoras y secuencias de componentes de fusión. 20

El término "vector", como se usa en el presente documento, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. El vector puede ser un plásmido, es decir, un trozo de ADN circular bicatenario en el que pueden unirse segmentos de ADN adicionales. El vector puede ser un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales pueden unirse en el genoma viral. Los vectores pueden ser capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Los vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y así se replican juntos con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión"). 25 30

El término "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se usa en el presente documento, significa una célula en la que un vector de expresión recombinante se ha introducido. Debe entenderse que "célula hospedadora recombinante" y "célula hospedadora" significan no solo la célula objeto particular, sino también la progenie de una célula tal. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a tanto mutación como a influencias ambientales, tal progenie puede, en realidad, no ser idéntica a la célula parental, pero está todavía incluida dentro del alcance del término "célula hospedadora" como se usa en el presente documento. 35 40

El término "hibridar selectivamente" referido en el presente documento significa unir detectablemente y específicamente. Polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos descritos en el presente documento pueden hibridarse selectivamente con hebras de ácido nucleico bajo condiciones de hibridación y de lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Pueden usarse condiciones de "alta rigurosidad" o "altamente rigurosas" para lograr condiciones de hibridación selectivas como se conoce en la técnica y se trata en el presente documento. Un ejemplo de condiciones de "alta rigurosidad" o "altamente rigurosas" es la incubación de un polinucleótido con otro polinucleótido, en el que un polinucleótido puede fijarse a una superficie sólida tal como una membrana, en un tampón de hibridación de 6X SSPE o SSC, 50 % de formamida, 5X reactivo de Denhardt, 0,5 % de SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a una temperatura de hibridación de 42 °C durante 12-16 horas, seguido de lavado doble a 55 °C usando un tampón de lavado de 1X SSC, 0,5 % de SDS. Véase también Sambrook et al., arriba, pp. 9.50-9.55. 45 50

El término "región CDR" o "CDR" está previsto indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina como se define por Kabat et al. 1991 (Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Edición. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington), y ediciones posteriores, o como se define en el presente documento. Un anticuerpo normalmente contiene 3 CDRs de cadena pesada y 3 CDRs de cadena ligera. El término CDR o CDRs se usa aquí con el fin de indicar, según el caso, una de estas regiones o varias, o incluso el total, de estas regiones que contienen la mayoría de los restos de aminoácidos responsables de la unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítopo que reconoce. 55 60

Entre las seis secuencias de CDR cortas, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad, esencialmente debido a los mecanismos de disposición de los genes que dan lugar a ella). Puede ser tan corta como 2 aminoácidos, aunque el tamaño más largo conocido es 26. La longitud de CDR también puede variar según la longitud que pueda ser acomodada por la región estructural subyacente particular. Funcionalmente, HCDR3 desempeña una función en parte en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal et al., PNAS, 71:4298-4302, 1974, Amit et al., Science, 233:747-753, 1986, Chothia et al., J. Mol. 65

Biol., 196:901-917, 1987, Chothia et al., Nature, 342:877- 883, 1989, Caton et al., J. Immunol., 144:1965-1968, 1990, Sharon et al., PNAS, 87:4814-4817, 1990, Sharon et al., J. Immunol., 144:4863-4869, 1990, Kabat et al., J. Immunol., 147:1709-1719, 1991).

5 El término un "conjunto de CDRs", referido en el presente documento, comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Así, un conjunto de HCDRs se refiere a HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y un conjunto de LCDRs se refiere a LCDR1, LCDR2 y LCDR3. A menos que se establezca de otro modo, un "conjunto de CDRs" incluye HCDRs y LCDRs.

10 El término "porcentaje de identidad de secuencia" en el contexto de secuencias de nucleótidos significa los restos en dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para correspondencia máxima. La longitud de la comparación de identidad de secuencia puede ser a lo largo de un tramo de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos, más normalmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más normalmente al menos aproximadamente 32 nucleótidos, y preferentemente al menos aproximadamente 36, 48 o más nucleótidos.

15 Hay varios algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, pueden compararse secuencias de polinucleótidos usando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas en Wisconsin Package Versión 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que incluye, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258 (1996); Pearson, J. Mol. Biol. 276:71-84 (1998)). A menos que se especifique de otro modo, se usan parámetros por defecto para un programa o algoritmo particular. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de nucleótidos puede determinarse usando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) o usando Gap con sus parámetros por defecto como se proporciona en GCG Versión 6.1.

20

25

Una referencia a una secuencia de nucleótidos engloba su complemento, a menos que se especifique de otro modo. Así, debe entenderse que una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular engloba su hebra complementaria, con su secuencia complementaria.

30

Como se usa en el presente documento, los términos "porcentaje de identidad de secuencia" y "porcentaje de homología de secuencia" se usan indistintamente.

35 El término "similitud sustancial" o "similitud de secuencias sustancial", cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, significa que cuando se alinean óptimamente con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), hay identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente el 85 %, preferentemente al menos aproximadamente el 90 %, y más preferentemente al menos aproximadamente el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de las bases de nucleótidos, como se mide por cualquier algoritmo muy conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se trata anteriormente.

40

Como se aplica a polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias de péptidos, cuando se alinean óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto como se suministra con los programas, comparten al menos el 70 %, 75 % o el 80 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos el 90 % o el 95 % de identidad de secuencia, y más preferentemente al menos el 97 %, 98 % o el 99 % de identidad de secuencia. Pueden diferenciarse posiciones de restos que no son idénticas por sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que un resto de aminoácido se sustituye con otro resto de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobia). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos se diferencian la una de la otra por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Medios de preparación de este ajuste son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson, Methods Mol. Biol. 243:307-31 (1994). Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales de hidroxilo alifáticas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Grupos de sustitución de aminoácidos conservativa son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina.

45

50

55

60

Alternativamente, una sustitución conservativa es cualquier cambio que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 desvelada en Gonnet et al., Science 256:1443-45 (1992). Una sustitución "moderadamente conservativa" es cualquier cambio que tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

65

La identidad de secuencia para polipéptidos normalmente se mide usando software de análisis de secuencias. El software de análisis de proteínas hace coincidir secuencias usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, que incluyen sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit" que pueden usarse con parámetros por defecto como se especifica por los programas para determinar homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína natural y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1 (Universidad de Wisconsin, WI). Las secuencias de polipéptidos también pueden compararse usando FASTA usando parámetros por defecto o recomendados, véase GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000)). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia descrita en el presente documento con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente blastp o tblastn, usando parámetros por defecto como se suministran con los programas. Véase, por ejemplo, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997).

La longitud de secuencias de polipéptidos comparada para homología generalmente será al menos aproximadamente 16 restos de aminoácidos, normalmente al menos aproximadamente 20 restos, más normalmente al menos aproximadamente 24 restos, normalmente al menos aproximadamente 28 restos, y preferentemente superior a aproximadamente 35 restos. Cuando se busca en una base de datos que contiene secuencias de un gran número de organismos diferentes, es preferible comparar secuencias de aminoácidos.

Como se trata en el presente documento, se contemplan, como englobadas por la presente divulgación, variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina, proporcionando que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, 90 %, 95 %, y lo más preferentemente el 99 % de identidad de secuencia con los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina descritos en el presente documento. En particular, se contemplan sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que tienen cadenas laterales relacionadas. Los aminoácidos genéticamente codificados se dividen generalmente en familias: (1) ácidos=aspartato, glutamato; (2) básicos=lisina, arginina, histidina; (3) no polares=alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga=glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Familias más preferidas son: serina y treonina son una familia hidroxil alifática; asparagina y glutamina son una familia que contiene amida; alanina, valina, leucina e isoleucina son una familia alifática; y fenilalanina, triptófano y tirosina son una familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tenga un efecto importante sobre la función de unión o propiedades de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no implica un aminoácido dentro de un sitio estructural. Si un cambio de aminoácido produce o no un péptido funcional puede determinarse fácilmente ensayando la actividad específica del polipéptido derivado. Ensayos se describen en detalle en el presente documento. Fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina pueden ser fácilmente preparados por aquellos expertos habituales en la materia. Extremos amino y carboxi preferidos de fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de dominios funcionales. Pueden identificarse dominios estructurales y funcionales por comparación de datos de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o patentadas. Preferentemente, se usan métodos de comparación computerizada para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de proteínas predichos que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen métodos de identificación de secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie et al., *Science* 253:164 (1991). Así, los ejemplos anteriores demuestran que aquellos expertos en la materia pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que pueden usarse para definir dominios estructurales y funcionales según los anticuerpos descritos en el presente documento.

Un sitio de unión al antígeno está generalmente formado por los dominios de inmunoglobulina pesados variables (VH) y ligeros variables (VL), con la interfase de unión al antígeno formada por seis bucles de polipéptido de superficie, llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Hay tres CDRs en cada VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y en cada VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), junto con regiones estructurales (FRs).

Normalmente, un dominio VH se empareja con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión al antígeno de anticuerpo, aunque un dominio VH o VL solo puede usarse para unir el antígeno. El dominio VH (véase la Tabla 4) puede emparejarse con el dominio VL (véase la Tabla 5), de manera que se forme un sitio de unión al antígeno de anticuerpo que comprende tanto los dominios VH como VL. Las cadenas VH en la Tabla 4 pueden emparejarse con un dominio VL heterólogo en la Tabla 5. La promiscuidad de la cadena ligera está bien establecida en la materia. Así, la cadena de VH de origen o de cualquiera de los anticuerpos en la Tabla 4 puede emparejarse con la cadena VL de origen o de cualquiera de los anticuerpos en la Tabla 5 u otro anticuerpo.

Un sitio de unión al antígeno puede comprender un conjunto de CDRs de H y/o L del anticuerpo de origen o cualquiera de los anticuerpos en la Tabla 1 con tantas como veinte, dieciséis, diez, nueve o menos, por ejemplo una, dos, tres, cuatro o cinco, adiciones, sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos dentro del conjunto desvelado de CDRs de H y/o L. Alternativamente, un sitio de unión al antígeno puede comprender un conjunto de CDRs de H y/o L del anticuerpo de origen o cualquiera de los anticuerpos de la Tabla 1 con hasta veinte, dieciséis, diez, nueve o menos, por ejemplo uno, dos, tres, cuatro o cinco, sustituciones de aminoácidos dentro del conjunto desvelado de CDRs de H y/o L. Tales modificaciones pueden hacerse posiblemente en cualquier resto dentro del conjunto de CDRs.

Sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteína, (4) alteran las afinidades de unión, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diversas mutaciones de una secuencia distinta de la secuencia de péptidos que existe de forma natural. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples (preferentemente sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia que existe de forma natural (preferentemente en la porción del polipéptido fuera del (de los) dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácidos conservativa no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia de origen (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debe tender a romper una hélice que se produce en la secuencia de origen, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia de origen). Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton et al., *Nature* 354:105 (1991).

También se divulga en el presente documento una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH que tiene al menos aproximadamente el 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VH de cualquiera de los anticuerpos enumerados en la Tabla 1, el listado de secuencias adjunto, un anticuerpo descrito en el presente documento o con una HCDR (por ejemplo, HCDR1, HCDR2 o HCDR3) mostrada en la Tabla 4 o Tabla 4(a). La molécula de anticuerpo puede también comprender opcionalmente un dominio VL que tiene al menos aproximadamente el 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VL de cualquiera de los anticuerpos enumerados en la Tabla 1, el listado de secuencias adjunto, un anticuerpo descrito en el presente documento o con una LCDR (por ejemplo, LCDR1, LCDR2, o LCDR3) mostrada en la Tabla 5. Algoritmos que pueden usarse para calcular el % de identidad de dos secuencias de aminoácidos comprenden, por ejemplo, BLAST (Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 405-410), FASTA (Pearson and Lipman (1988) *PNAS USA* 85: 2444-2448), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith and Waterman (1981) *J. Mol Biol.* 147: 195-197), por ejemplo, empleando parámetros por defecto.

Además, variantes de los dominios VH y VL y CDRs, que incluyen aquellos para las que se exponen las secuencias de aminoácidos en el presente documento, y que pueden emplearse en los agentes de unión elegidos como diana y anticuerpos para ERBB2, pueden obtenerse por medio de métodos de alteración o mutación de secuencias y cribado para la elección como diana de antígeno con características deseadas. Ejemplos de características deseadas incluyen, pero no se limitan a: elevada afinidad de unión por el antígeno con respecto a anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno; elevada neutralización de una actividad de antígeno con respecto a anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno si la actividad es conocida; capacidad competitiva especificada con un anticuerpo o ligando conocido con respecto al antígeno a una relación molar específica; capacidad para inmunoprecipitar complejo; capacidad para unirse a un epítoto especificado; epítoto lineal, por ejemplo, secuencia de péptidos identificada usando barrido de unión a péptido como se describe en el presente documento, por ejemplo, usando péptidos cribados en conformación lineal y/o restringida; epítoto conformacional, formado por restos no continuos; capacidad para modular una nueva actividad biológica de ERBB2, o molécula en la dirección 3'. Tales métodos también se proporcionan en el presente documento.

Pueden producirse y usarse variantes de moléculas de anticuerpo desveladas en el presente documento. Siguiendo el ejemplo de química computacional en aplicar técnicas de análisis multifactorial de datos a las relaciones estructura/propiedad-actividad (Wold, et al. *Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics -Mathematics and Statistics in Chemistry* (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984) pueden derivarse relaciones cuantitativas de actividad-propiedad de anticuerpos usando técnicas matemáticas muy conocidas, tales como regresión estadística, reconocimiento y clasificación de patrones (Norman et al. *Applied Regression Analysis*. Wiley-Interscience; 3ª edición (abril de 1998); Kandel, Abraham & Backer, Eric. *Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis*. Prentice Hall PTR, (11 de mayo de 1995); Krzanowski, Wojtek. *Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective* (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (diciembre de 2000); Witten, Ian H. & Frank, Eibe. *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations*. Morgan Kaufmann; (11 de octubre de 1999); Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. *Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression* (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (julio de 2002); Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N. *Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery*). Las propiedades de anticuerpos pueden derivar de modelos empíricos y teóricos

(por ejemplo, análisis de restos de contacto probables o propiedad fisicoquímica calculada) de secuencia de anticuerpos, estructuras funcionales y tridimensionales, y estas propiedades pueden considerarse individualmente y en combinación.

5 Este estudio de relación secuencia-estructura puede usarse para la predicción de aquellos restos en un anticuerpo de secuencia conocida, pero de una estructura tridimensional desconocida, que son importantes en el mantenimiento de la estructura tridimensional de sus bucles de CDR y, por lo tanto, mantienen la especificidad de unión. Estas predicciones pueden ser respaldadas por comparación de las predicciones con la salida de los experimentos de optimización de ejemplo. En un enfoque estructural, puede crearse un modelo de la molécula de anticuerpo usando cualquier paquete libremente disponible o comercial, tal como WAM. Un paquete de software de visualización y análisis de proteínas, tal como Insight II (Accelrys, Inc.) o Deep View puede entonces usarse para evaluar posibles sustituciones en cada posición en la CDR. Esta información puede entonces usarse para hacer sustituciones que probablemente tienen un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad.

15 Las técnicas requeridas para hacer sustituciones dentro de secuencias de aminoácidos de CDRs, dominios VH o VL de anticuerpos y/o agentes de unión elegidos como diana generalmente están disponibles en la materia. Pueden hacerse secuencias de variante, con sustituciones que puede o puede no predecirse que tengan un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, y probarse para la capacidad para unirse a y/o neutralizar una diana y/o para cualquier propiedad deseada.

20 Como se usa en el presente documento, los términos "marca" o "marcado" se refieren a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo o agente de unión dirigido. La marca puede ser un marcador detectable, por ejemplo, incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos biotínico que pueden detectarse por avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse por métodos ópticos o colorimétricos). La marca o marcador pueden ser terapéuticos, por ejemplo, un fármaco conjugado o toxina. Se conocen en la técnica diversos métodos de marcado de polipéptidos y glucoproteínas y pueden usarse. Ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³²P, ³³P, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánido), marcas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopes de polipéptido predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, marcas de epítopes), agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio, toxinas tales como toxina de pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Las marcas pueden unirse por brazos de espaciador de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

40 Como se usa en el presente documento, un "agente de unión dirigido" es un agente, por ejemplo, anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, que se une preferencialmente a un sitio diana. El agente de unión dirigido puede ser específico para solo un sitio diana, o para más de un sitio diana. El agente de unión dirigido puede ser un anticuerpo monoclonal y el sitio diana puede ser un epítope. Como se describe a continuación, un agente de unión dirigido puede comprender al menos un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo, en el que dicho dominio está fusionado o contenido dentro de un armazón de proteína heterólogo, por ejemplo, un armazón de proteína no de anticuerpo.

50 En toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se entenderá que implica la inclusión de un número entero establecido o grupo de números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

Anticuerpos anti-ErbB2 humanos y caracterización de los mismos

55 En el presente documento se divulga un agente de unión dirigido a anti-ErbB2, en particular anticuerpos anti-ErbB2. Los anticuerpos anti-ErbB2 divulgados en el presente documento pueden ser anticuerpos humanos. Los anticuerpos anti-ErbB2 pueden unirse a ErbB2 humana sin la secuencia señal, aminoácidos 1-22 (Genbank ID: P04626) (SEQ ID NO:45). Los anticuerpos anti-ErbB2 humanos pueden producirse inmunizando un animal transgénico no humano, por ejemplo, un roedor, cuyo genoma comprende genes de la inmunoglobulina humana de manera que el animal transgénico produzca anticuerpos humanos.

60 Un anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento puede comprender una cadena ligera kappa humana o una lambda humana, o una secuencia de aminoácidos derivada de las mismas. Cuando el anticuerpo anti-ErbB2 comprende una cadena ligera kappa, el dominio variable de la cadena ligera (VL) está codificado en parte por un gen de la familia VK1, VK2 o VK4 humano. La cadena ligera puede utilizar un gen A1 de VK, A2 de VK, B3 de VK o L1 de VK humano.

65

El dominio variable de la cadena ligera puede utilizar un gen A2 humano y un gen JK1 humano; un gen L1 humano y un gen JK5 humano; un gen B3 humano y un gen JK3 humano; o un gen A1 humano y un gen JK4 humano.

VL del anticuerpo contra ErbB2 puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la línea germinal del gen humano. VL del anticuerpo anti-ErbB2 puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. VL del anticuerpo anti-ErbB2 puede comprender 0, 1 o 2 inserciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. Una o más de aquellas sustituciones de la línea germinal pueden estar en las regiones CDRs de la cadena ligera. Las sustituciones de aminoácidos con respecto a la línea germinal pueden ser en una o más de las mismas posiciones como sustituciones con respecto a la línea germinal en uno cualquiera o más de VL de los anticuerpos 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3. Por ejemplo, VL de un anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento puede contener una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con la línea germinal encontrada en VL del anticuerpo 1.14, o puede ser una o más de las sustituciones de aminoácidos en comparación con la línea germinal encontrada en VL del anticuerpo 1.18. Los cambios de aminoácidos pueden ser en una o más de las mismas posiciones, pero pueden implicar una sustitución diferente que en el anticuerpo de referencia.

Pueden producirse cambios de aminoácidos con respecto a la línea germinal en una o más de las mismas posiciones que en cualquiera de VL de los anticuerpos 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3, pero los cambios pueden representar sustituciones de aminoácidos conservativas en tal(es) posición (posiciones) con respecto al aminoácido en el anticuerpo de referencia. Por ejemplo, si una posición particular en uno de estos anticuerpos se cambia con respecto a la línea germinal y es glutamato, puede sustituirse aspartato en esa posición. Similarmente, si una sustitución de aminoácidos en comparación con la línea germinal es serina, puede sustituirse conservativamente treonina por serina en esa posición. Sustituciones de aminoácidos conservativas se tratan arriba.

La cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2 humano puede comprender la secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 1.44.1 (SEQ ID NO:4), 1.140 (SEQ ID NO:8), 1.43.1 (SEQ ID NO:12), 1.14.1 (SEQ ID NO:16), 1.100.1 (SEQ ID NO:20), 1.96.2 (SEQ ID NO:24), 1.18.1 (SEQ ID NO:28), 1.20.1 (SEQ ID NO:32), 1.39.1 (SEQ ID NO:36), 1.24.3 (SEQ ID NO:40), 1.71.3 (SEQ ID NO:44) o dicha secuencia de aminoácidos que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de hasta 3 sustituciones de aminoácidos no conservativas.

La cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2 puede comprender las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la región VL de un anticuerpo seleccionado de anticuerpo 1.44.1 (SEQ ID NO:4), 1.140 (SEQ ID NO:8), 1.43.1 (SEQ ID NO:12), 1.14.1 (SEQ ID NO:16), 1.100.1 (SEQ ID NO:20), 1.96.2 (SEQ ID NO:24), 1.18.1 (SEQ ID NO:28), 1.20.1 (SEQ ID NO:32), 1.39.1 (SEQ ID NO:36), 1.24.3 (SEQ ID NO:40) 1.71.3 (SEQ ID NO:44) o dichas regiones CDRs tienen cada una menos de 4 o menos de 3 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de tres o menos sustituciones de aminoácidos no conservativas.

Con respecto a la cadena pesada, el dominio variable (VH) puede codificarse en parte por un gen de la familia VH3 o VH4 humano. VH de cadena pesada puede utilizar un gen VH3-21, VH3-13, VH4-31 o VH3-7 humano. VH de cadena pesada puede utilizar un gen VH3-21 humano, un gen D5-24 humano y un gen JH4B humano. VH de cadena pesada puede utilizar un gen VH3-7 humano y un JH6 humano; un gen VH4-31 humano, un gen D3-10 humano y un gen JH6B humano; o un gen VH3-13 humano, un gen D6-19 humano y un gen JH6B humano. La secuencia de VH del anticuerpo anti-ErbB2 puede contener una o más sustituciones, deleciones o inserciones (adiciones) de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la línea germinal.

El dominio variable de la cadena pesada puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 mutaciones de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal; 0, 1, 2 o 3 de las cuales pueden ser sustituciones. El dominio variable de la cadena pesada puede comprender 0, 1, 2 o 3 adiciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. La(s) mutación (mutaciones) puede(n) ser sustituciones no conservativas en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. Las mutaciones pueden ser en las regiones CDRs de la cadena pesada. Pueden hacerse cambios de aminoácido en una o más de las mismas posiciones como mutaciones de la línea germinal en uno cualquiera o más de VH de los anticuerpos 1.14.1, 1.18.1, 1.19, 1.20.1, 1.22.1, 1.22.2, 1.24.3, 1.41, 1.43.1, 1.43.2, 1.44.1, 1.39.1, 1.71.1, 1.71.3, 1.96.2, 1.99, 1.100.1, 1.104, 1.107, 1.124, 1.128, 1.140.1 o 1.148. Los cambios de aminoácidos pueden ser en una o más de las mismas posiciones, pero pueden implicar a una mutación diferente de aquella en el anticuerpo de referencia.

La cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 1.44.1 (SEQ ID NO:2), 1.140.1 (SEQ ID NO:6), 1.43.1 (SEQ ID NO:10), 1.14.1 (SEQ ID NO:14), 1.100.1 (SEQ ID NO:18), 1.96.2 (SEQ ID NO:22), 1.18.1 (SEQ ID NO:26), 1.20.1 (SEQ ID NO:30), 1.39.1 (SEQ ID NO:34), 1.24.3 (SEQ ID NO:38), 1.71.3 (SEQ ID NO:42); o dicha secuencia de aminoácidos de VH que tienen hasta 1, 2, 3, 4, 6, 8 o 10 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de hasta 3 sustituciones de aminoácidos no conservativas.

La cadena pesada puede comprender las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 1.14.1, 1.18.1, 1.19, 1.20.1, 1.22.1, 1.22.2, 1.24.3, 1.41, 1.43.1, 143.2, 1.44.1, 1.39.1, 1.71.1, 1.71.3, 1.96.2, 1.99, 1.100.1, 1.104, 1.107, 1.124, 1.128, 1.140.1 o 1.148 o dichas regiones CDRs que tiene cada uno menos de 5, menos de 4, menos de 3, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de tres o menos sustituciones de aminoácidos no conservativas.

El anticuerpo puede comprender la cadena ligera como se ha desvelado anteriormente y una cadena pesada como se ha desvelado anteriormente. Las CDRs de cadena ligera y las CDRs de cadena pesada pueden ser del mismo anticuerpo.

Un tipo de sustitución de aminoácidos que puede hacerse es cambiar una o más cisteínas en el anticuerpo, que puede ser químicamente reactivo, con otro resto, tal como, sin limitación, alanina o serina c. Puede haber una sustitución de una cisteína no canónica. La sustitución puede hacerse en una CDR o región estructural de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. Alternativamente, la cisteína puede ser canónica.

Otro tipo de sustitución de aminoácidos que puede hacerse es cambiar cualquier sitio proteolítico posible en el anticuerpo. Tales sitios pueden producirse en una CDR o región estructural de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. La sustitución de restos de cisteína y la eliminación de sitios proteolíticos puede disminuir el riesgo de cualquier heterogeneidad en el producto de anticuerpo y así aumentar su homogeneidad. Otro tipo de sustitución de aminoácidos es eliminar pares de asparagina-glicina, que forman posibles sitios de desamidación, alterando uno o ambos de los restos. Todavía otro tipo de sustitución de aminoácidos es en restos de metionina para eliminar los sitios de oxidación.

Puede escindirse la lisina del extremo C de la cadena pesada del anticuerpo anti-ErbB2 divulgado en el presente documento. Las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos anti-ErbB2 pueden opcionalmente incluir una secuencia señal.

En el presente documento se describen anticuerpos monoclonales anti-ErbB2 humanos inhibidores y las líneas celulares del hibridoma que los producen. La Tabla 1 enumera los identificadores de secuencia (SEQ ID NO:) de los ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de las cadenas pesadas y ligeras, y las secuencias de aminoácidos deducidas correspondientes.

TABLA 1

ANTICUERPOS ANTI-ErbB2 HUMANOS				
Anticuerpo monoclonal	IDENTIFICADOR DE SECUENCIA (SEQ ID NO:)			
	Porción que comprende el dominio variable			
	Pesada		Ligera	
	ADN	Proteína	ADN	Proteína
1.44.1	1	2	3	4
1.140	5	6	7	8
1.43	9	10	11	12
1.14.1	13	14	15	16
1.100.1	17	18	19	20
1.96	21	22	23	24
1.18.1	25	26	27	28
1.20	29	30	31	32
1.39	33	34	35	36
1.24	37	38	39	40
1.71.3	41	42	43	44

Clase y subclase de anticuerpos anti-ErbB2

La clase y la subclase de los anticuerpos anti-ErbB2 pueden determinarse por cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y la subclase de un anticuerpo puede determinarse usando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particulares de anticuerpo. Tales anticuerpos están comercialmente disponibles. La clase y la subclase pueden determinarse por ELISA, o transferencia Western, además de otras técnicas. Alternativamente, la clase y la subclase pueden determinarse por secuenciación de toda o una porción de los dominios constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinando la clase y subclase de los anticuerpos.

El anticuerpo anti-ErbB2 puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-ErbB2 puede ser una molécula de IgG, una IgM, una IgE, una IgA o una IgD. El anticuerpo anti-ErbB2 puede ser una IgG y, en particular, una subclase

IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. El anticuerpo puede ser la subclase IgG2 (véase Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edn. US Department of Health and Human Services, Washington, DC).

Afinidad de unión de agentes de unión dirigidos a anti-ErbB2 y anticuerpos contra ErbB2

5 Los agentes de unión dirigidos y/o anticuerpos anti-ErbB2 descritos en el presente documento se unen a ErbB2 con alta afinidad. En el presente documento se describe un agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 que se une a ErbB2 con una K_D de $13,5 \times 10^{-9}$ M o menos usando análisis Biacore de alta resolución. En particular, el agente de unión dirigido y/o anticuerpo descritos en el presente documento se unen a ErbB2 con una K_D 13×10^{-9} M, 13×10^{-9} M, 11×10^{-9} M, 12×10^{-9} M, 10×10^{-9} M, 5×10^{-9} M, 3×10^{-9} M, 2×10^{-9} M, 1×10^{-9} M o 5×10^{-10} M o menos usando análisis Biacore de alta resolución. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo descrito en el presente documento puede unirse a ErbB2 con sustancialmente la misma K_D que un anticuerpo seleccionado de 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo descrito en el presente documento puede unirse a ErbB2 con sustancialmente la misma K_D que un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región V_H encontrada en SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 o 42, un dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región V_L encontrada en SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, o ambos. El anticuerpo descrito en el presente documento puede unirse a ErbB2 con sustancialmente la misma K_D que un agente de unión dirigido y/o un anticuerpo que comprende las regiones CDRs de un dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región V_L encontrada en SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 o que comprende las regiones CDRs de un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región V_H encontrada en SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 o 42, o ambos.

25 El agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento puede tener una constante de velocidad de disociación baja (k_{dis}). Los agentes de unión dirigidos y/o anticuerpo anti-ErbB2 descritos en el presente documento pueden tener una k_{dis} de $1,0 \times 10^{-3}$ s⁻¹ o más baja o una k_{dis} de $5,0 \times 10^{-4}$ s⁻¹ o más baja. El anticuerpo descrito en el presente documento puede unirse a ErbB2 con una k_{dis} de 2×10^{-4} s⁻¹ o más baja. La k_{dis} puede ser sustancialmente la misma que un anticuerpo descrito en el presente documento, que incluye un anticuerpo seleccionado de 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo descrito en el presente documento puede unirse a ErbB2 con sustancialmente la misma k_{dis} que un anticuerpo que comprende las regiones CDRs de una cadena pesada, o las regiones CDRs de una cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3, o ambos. Los agentes de unión dirigidos y/o anticuerpo descritos en el presente documento pueden unirse a ErbB2 con sustancialmente la misma k_{dis} que un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región V_H encontrada en SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 o 42, un dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región V_L encontrada en SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 o ambos.

40 La afinidad de unión y la velocidad de disociación de un agente de unión dirigido y un anticuerpo anti-ErbB2 por ErbB2 pueden determinarse por métodos conocidos en la técnica. La afinidad de unión puede medirse por ELISAs, RIAs, citometría de flujo, resonancia de plasmones superficiales, tales como BIACORE™. La velocidad de disociación puede medirse por resonancia de plasmones superficiales. Preferentemente, la afinidad de unión y la velocidad de disociación se miden por resonancia de plasmones superficiales. Más preferentemente, la afinidad de unión y la velocidad de disociación se miden usando BIACORE™. Puede determinarse si un anticuerpo tiene sustancialmente la misma K_D que un anticuerpo anti-ErbB2 usando métodos conocidos en la técnica. El Ejemplo 12 ejemplifica un método de determinación de constantes de afinidad de anticuerpos monoclonales anti-ErbB2 por citometría de flujo.

Identificación de epítopes de ErbB2 reconocidos por anticuerpos anti-ErbB2

55 En el presente documento se divulgan agentes de unión dirigidos y/o anticuerpos monoclonales anti-ErbB2 humanos que pueden unirse a ErbB2 y pueden competir o pueden competir con y/o se unen al mismo epítipo que: (a) un anticuerpo seleccionado de 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3; (b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos del dominio variable encontrada en SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 o 42, (c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos del dominio variable de SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, o (d) un anticuerpo que comprende tanto un dominio variable de la cadena pesada como se define en (b) como un dominio variable de la cadena ligera como se define en (c). Si dos anticuerpos compiten recíprocamente entre sí para unirse a ErbB2, se dice que compiten.

65 Puede determinarse si un agente de unión dirigido y/o un anticuerpo se une al mismo epítipo o compite por la unión con un anticuerpo anti-ErbB2 usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se permite que el anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento se una a ErbB2 bajo condiciones de saturación y entonces se mide la

capacidad del anticuerpo de prueba para unirse a ErbB2. Si el anticuerpo de prueba es capaz de unirse a ErbB2 al mismo tiempo que el anticuerpo anti-ErbB2, entonces el anticuerpo de prueba se une a un epítoto diferente que el anticuerpo anti-ErbB2. Sin embargo, si el anticuerpo de prueba no es capaz de unirse a ErbB2 al mismo tiempo, entonces el anticuerpo de prueba se une al mismo epítoto, un epítoto de superposición, o un epítoto que está en estrecha proximidad al epítoto unido por el anticuerpo anti-ErbB2 humano. Este experimento puede realizarse usando ELISA, RIA, BIACORE™ o citometría de flujo.

Para probar si un agente de unión dirigido y/o un anticuerpo anti-ErbB2 compiten con otro anticuerpo anti-ErbB2, puede usarse el método de competición descrito anteriormente en dos direcciones, es decir, determinar si el anticuerpo de referencia bloquea al anticuerpo de prueba y viceversa. Alternativamente, el experimento se realiza usando ELISA. Métodos de determinación de K_D se tratan adicionalmente a continuación.

Inhibición de la actividad de ErbB2 por el anticuerpo anti-ErbB2

En el presente documento se describen agentes de unión dirigidos y/o anticuerpos anti-ErbB2 que inhiben la señalización mediante ErbB2. El agente de unión dirigido y/o un anticuerpo anti-ErbB2 pueden inhibir la señalización inducida por ligando de ErbB2 posiblemente sin bloquear la unión del ligando a ErbB2. El ErbB2 puede ser humano. El anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento puede ser un anticuerpo humano. El ligando puede ser heregulina- β . La CE_{50} del agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 puede medirse detectando la unión del anticuerpo al antígeno en un ensayo de unión directa monitorizado por ELISA o RIA, o mediante ensayos basados en célula tales como aquellos descritos más adelante. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo o porción del mismo descritos en el presente documento pueden inhibir la señalización inducida por ligando mediante el receptor de ErbB2 con una CE_{50} no superior a 50 ng/ml, preferentemente no superior a 25 ng/ml, más preferentemente no superior a 10 ng/ml, incluso más preferentemente no superior a 5 ng/ml. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 descritos en el presente documento pueden inhibir la señalización inducida por ligando de ErbB2 al menos el 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %. La medición de la inhibición puede llevarse a cabo mediante cualquier medio conocido en la técnica.

En el presente documento se describen agentes de unión dirigidos y/o anticuerpos anti-ErbB2 que pueden inhibir la fosforilación de ErbB2. La CE_{50} del agente de unión dirigido y/o anticuerpo puede ser no superior a 50 ng/ml, preferentemente no superior a 25 ng/ml, más preferentemente no superior a 10 ng/ml, incluso más preferentemente no superior a 5 ng/ml. Los agentes de unión dirigidos y/o anticuerpo anti-ErbB2 descritos en el presente documento pueden inhibir la fosforilación de ErbB2 al menos el 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %. Los Ejemplos 4, 9 y 11 ejemplifican un ensayo de fosforilación de ErbB2.

En el presente documento se describen agentes de unión dirigidos y/o anticuerpos anti-ErbB2 que pueden inhibir la activación de la vía MAPK. La CE_{50} del agente de unión dirigido y/o anticuerpo puede ser no superior a 50 ng/ml, preferentemente no superior a 25 ng/ml, más preferentemente no superior a 10 ng/ml, incluso más preferentemente no superior a 5 ng/ml. En el presente documento se describen agentes de unión dirigidos y/o anticuerpos anti-ErbB2 que pueden inhibir la fosforilación de ErbB2 al menos el 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %. Se conocen en la técnica ensayos para monitorizar la activación de la vía MAPK en una célula (véanse las solicitudes de patente de EE.UU. N.º 20030186382 y 20030096333).

En el presente documento se describen agentes de unión dirigidos y/o anticuerpos anti-ErbB2 que pueden modular la actividad de la vía p38-TSP-1. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo descritos en el presente documento pueden activar la vía p38-TSP-1. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo descritos en el presente documento pueden inhibir la vía p38-TSP-1. La CE_{50} del agente de unión dirigido y/o anticuerpo puede ser no superior a 50 ng/ml, preferentemente no superior a 25 ng/ml, más preferentemente no superior a 10 ng/ml, incluso más preferentemente no superior a 5 ng/ml. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 descritos en el presente documento pueden inhibir la fosforilación de ErbB2 al menos el 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %. Se conocen en la técnica ensayos para monitorizar la activación de la vía p38-TSP-1 (véanse las solicitudes de patente de EE.UU. N.º 20060089393 y 20020103253).

En el presente documento se describen agentes de unión dirigidos y/o anticuerpos anti-ErbB2 que pueden inhibir la activación de la vía PI3K. La CE_{50} del agente de unión dirigido y/o anticuerpo descritos en el presente documento puede ser no superior a 50 ng/ml, preferentemente no superior a 25 ng/ml, más preferentemente no superior a 10 ng/ml, incluso más preferentemente no superior a 5 ng/ml. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 descritos en el presente documento pueden inhibir la fosforilación de ErbB2 al menos el 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %. Se conocen en la técnica ensayos para monitorizar la activación de la vía PI3K en una célula (véanse las solicitudes de patente de EE.UU. N.º 20020037276 y 20040176385).

En el presente documento se describen agentes de unión dirigidos y/o anticuerpos anti-ErbB2 que pueden inhibir la inhibición de CDC2. La CE_{50} del agente de unión dirigido y/o el anticuerpo puede ser no superior a 50 ng/ml,

preferentemente no superior a 25 ng/ml, más preferentemente no superior a 10 ng/ml, incluso más preferentemente no superior a 5 ng/ml. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 pueden inhibir la fosforilación de ErbB2 al menos el 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %. Se conocen en la técnica ensayos para monitorizar la inhibición de CDC2 en una célula (véanse las solicitudes de patente de EE.UU. N.º 20030225098 y 20040110775).

Inhibición de la proliferación celular con anticuerpos anti-ErbB2

En el presente documento se describen agentes de unión dirigidos y/o anticuerpos anti-ErbB2 que pueden inhibir la proliferación de cáncer o células transformadas *in vivo* o *in vitro* o ambos. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 descritos en el presente documento pueden inhibir la proliferación al menos el 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %. La fosforilación puede medirse al menos 1 día después de que los animales hayan empezado el tratamiento con el anticuerpo y la proliferación puede medirse 3 días después de que los animales hayan empezado el tratamiento con el anticuerpo. Alternativamente, la inhibición puede medirse al menos una hora después de que los animales hayan empezado el tratamiento con el anticuerpo. La CE₅₀ del agente de unión dirigido y/o anticuerpo descritos en el presente documento, como se mide por el título de células o un marcador de proliferación, puede ser no superior a 3,5 µg/ml, preferentemente no superior a 300 ng/ml, más preferentemente no superior a 100 ng/ml, incluso más preferentemente no superior a 50 ng/ml. Los Ejemplos 9 y 10 ejemplifican ensayos de proliferación.

Especies y selectividad molecular

Los agentes de unión dirigidos y/o anticuerpos anti-ErbB2 descritos en el presente documento pueden demostrar tanto selectividad de especie como molecular. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 descritos en el presente documento pueden unirse a ErbB2 humana (SEQ ID NO:45) y de cinomolgo. Siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva, puede determinarse la selectividad de especie por el agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 usando métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede determinarse la selectividad de especie usando transferencia Western, citometría de flujo, ELISA, inmunoprecipitación o RIA. Por ejemplo, puede determinarse la selectividad de especie usando citometría de flujo.

Los presente inventores describen en el presente documento un agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 que no presenta ninguna unión específica apreciable a cualquier otra proteína distinta de ErbB2. Puede determinarse la selectividad del agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 por ErbB2 usando métodos muy conocidos en la técnica siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva. Por ejemplo, puede determinarse la selectividad usando transferencia Western, citometría de flujo, ELISA, inmunoprecipitación o RIA.

Métodos de producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpos

Los anticuerpos humanos descritos en el presente documento pueden producirse inmunizando un animal transgénico no humano que comprende dentro de su genoma algunos o todos de los loci de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina humana con un antígeno ErbB2. Por ejemplo, el animal no humano es un animal XENOMOUSE™ (Amgen Fremont, Inc., Fremont, CA).

Ratones XENOMOUSE™ son cepas de ratón manipuladas que comprenden grandes fragmentos de loci de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina humana y son deficientes en la producción de anticuerpos en ratón. Véanse, por ejemplo, Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994) y las patentes de EE.UU. 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, 6.130.364, 6.162.963 y 6.150.584. Véanse también los documentos WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560 y WO 00/037504.

En el presente documento se describe un método de preparación de anticuerpos anti-ErbB2 a partir de animales no humanos no de ratón inmunizando animales transgénicos no humanos que comprenden loci de inmunoglobulina humana con un antígeno ErbB2. Tales animales pueden producirse usando los métodos descritos en los documentos anteriormente citados. Los métodos desvelados en estos documentos pueden modificarse como se describe en la patente de EE.UU. 5.994.619. La patente de EE.UU. 5.994.619 describe métodos de producción de novedosas células de masa de células internas cultivadas (CICM) y líneas celulares, derivadas de cerdos y vacas, y células CICM transgénicas en las que se ha insertado el ADN heterólogo. Pueden usarse células transgénicas CICM para producir embriones transgénicos clonados, fetos y descendencia. La patente '619 también describe métodos de producción de animales transgénicos que son capaces de transmitir el ADN heterólogo a su progenie. Preferentemente, los animales no humanos son mamíferos, particularmente ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos.

Ratones XENOMOUSE™ producen un repertorio humano tipo adulto de anticuerpos completamente humanos y genera anticuerpos humanos específicos de antígeno. Los ratones XENOMOUSE™ pueden contener aproximadamente el 80 % del repertorio de genes V del anticuerpo humano mediante la introducción de fragmentos de configuración de la línea germinal de los loci de cadena pesada humana y los loci de cadena ligera kappa en

cromosoma artificial de levadura (YAC). Los ratones XENOMOUSE™ pueden contener además aproximadamente todo el locus de cadena ligera lambda humana. Véase Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits, J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), y el documento WO 98/24893. Los anticuerpos pueden producirse en ratones trans-cromosómicos humanos (véanse los documentos WO 02/43478 y WO 02/092812).

El animal no humano que comprende genes de la inmunoglobulina humana pueden ser animales que tienen un "minilocus" de inmunoglobulina humana. En el enfoque de minilocus, un locus de Ig exógena se imita mediante la inclusión de genes individuales del locus de Ig. Así, uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, un dominio constante mu y un segundo dominio constante (preferentemente un dominio constante gamma) se forman en una construcción para la inserción en un animal. Este enfoque se describe, entre otros, en las patentes de EE.UU. N.º 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215 y 5.643.763.

En el presente documento se describe un método de preparación de anticuerpos anti-ErbB2 humanizados. Los animales no humanos pueden inmunizarse con un antígeno ErbB2 como se describe más adelante en condiciones que permiten la producción de anticuerpos. Se aíslan células productoras de anticuerpo de los animales, se fusionan con mielomas para producir hibridomas y se aíslan ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo anti-ErbB2 de interés. Estos ácidos nucleicos se manipulan posteriormente usando técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia y como se describen adicionalmente más adelante para reducir la cantidad de secuencia no humana, es decir, para humanizar el anticuerpo para reducir la respuesta inmunitaria en seres humanos.

El antígeno ErbB2 puede ser ErbB2 aislado y/o purificado. El antígeno ErbB2 puede ser ErbB2 humana. El antígeno ErbB2 puede ser un fragmento de ErbB2. El fragmento ErbB2 puede ser un dominio extracelular de ErbB2. El fragmento ErbB2 puede ser un bucle extracelular de ErbB2 (véase Cho et al., Nature. 2003 Feb 13;421(6924):756-60). El fragmento de ErbB2 puede comprender al menos un epítipo de ErbB2. El antígeno ErbB2 puede ser una célula que expresa o expresa en exceso ErbB2, o un fragmento inmunogénico del mismo, sobre su superficie. En algunos casos, el antígeno ErbB2 es una proteína de fusión de ErbB2. En otros casos, ErbB2 es un inmunógeno de péptido sintético.

La inmunización de animales puede ser por cualquier método conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Métodos de inmunización de animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado vacuno y caballos son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane, arriba, y la patente de EE.UU. 5.994.619. El antígeno ErbB2 puede administrarse con un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Adyuvantes a modo de ejemplo incluyen adyuvante completo o incompleto de Freund, RIBI (muramil dipéptidos) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger al polipéptido de la rápida dispersión secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan el hospedador para secretar factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmunitario. Preferentemente, si un polipéptido está siendo administrado, el programa de inmunización implicará a dos o más administraciones del polipéptido, extendidas durante varias semanas. El Ejemplo 1 ejemplifica un método de producción de anticuerpos monoclonales anti-ErbB2 en ratones Xenomouse™.

Producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpos

Después de la inmunización de un animal con un antígeno ErbB2, pueden obtenerse anticuerpos y/o células productoras de anticuerpo a partir del animal. El suero que contiene anticuerpos anti-ErbB2 puede obtenerse del animal por sangrado o sacrificando el animal. El suero puede usarse como se obtiene del animal, puede obtenerse una fracción de inmunoglobulina del suero, o los anticuerpos anti-ErbB2 pueden purificarse a partir del suero.

Se pueden preparar líneas celulares inmortalizadas productoras de anticuerpos a partir de células aisladas del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y se immortalizan células de los ganglios linfáticos y/o linfocitos B esplénicos mediante cualquier medio conocido en la técnica. Métodos de immortalización de células incluyen, pero no se limitan a, transfectarlas con oncogenes, infectarlas con un virus oncogénico y cultivarlas en condiciones que seleccionen células inmortalizadas, sometiendo a compuestos carcinogénicos o mutantes, fusionándolas con una célula inmortalizada, por ejemplo, una célula de mieloma, e inactivando un gen supresor de tumor. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane, arriba. Si se usa fusión con células de mieloma, las células de mieloma preferentemente no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Se criban células inmortalizadas usando ErbB2, una porción de la misma, o una célula que expresa ErbB2. El cribado inicial puede realizarse usando un inmunoensayo unido a enzima (ELISA) o un radioinmunoensayo. Un ejemplo de cribado de ELISA se proporciona en el documento WO 00/37504.

Las células productoras de anticuerpos anti-ErbB2, por ejemplo, hibridomas, se seleccionan, clonan y adicionalmente se criban para características deseables, que incluyen crecimiento robusto, alta producción de anticuerpos y características de anticuerpo deseables, como se trata adicionalmente más adelante. Los hibridomas pueden expandirse *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de un sistema inmunitario, por ejemplo,

ratones sin pelo, o en cultivo celular *in vitro*. Métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas son muy conocidos para aquellos expertos habituales en la materia.

5 El animal inmunizado puede ser un animal no humano que expresa genes de la inmunoglobulina humana y los linfocitos B esplénicos se fusionan con una línea de células de mieloma de la misma especie que el animal no humano. Más, preferentemente, el animal inmunizado es un ratón XENOMOUSE™ y la línea de células de mieloma es un mieloma de ratón no secretor. Aún más preferentemente, la línea de células de mieloma es P3-X63-Ag8.653 (Colección Americana de Cultivos Tipo). Véase, por ejemplo, el Ejemplo 2.

10 Así, en el presente documento se describen métodos de producción de una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento del mismo dirigido a ErbB2 que comprende (a) inmunizar un animal transgénico no humano descrito en el presente documento con ErbB2, una porción de ErbB2 o una célula o tejido que expresa ErbB2; (b) permitir que el animal transgénico genere una respuesta inmunitaria a ErbB2; (c) aislar células productoras de anticuerpos de animal transgénico; (d) immortalizar las células productoras de anticuerpos; (e) crear poblaciones monoclonales individuales de las células productoras de anticuerpos immortalizadas; y (f) cribar las células productoras de anticuerpos immortalizadas para identificar un anticuerpo dirigido a ErbB2.

15 En el presente documento se describen hibridomas que producen un anticuerpo anti-ErbB2 humano. Los hibridomas pueden ser hibridomas de ratón, como se ha descrito anteriormente. Los hibridomas pueden producirse en una especie no de ratón no humana tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos. Por ejemplo, los hibridomas son hibridomas humanos.

20 Las células productoras de anticuerpos pueden aislarse y expresarse en una célula hospedadora, por ejemplo células de mieloma. Un animal transgénico puede inmunizarse con ErbB2, células primarias, por ejemplo, células de bazo o de sangre periférica se aíslan de un animal inmunizado transgénico y se identifican células individuales que producen anticuerpos específicos para el antígeno deseado. Se aísla ARNm poliadenilado de cada célula individual y se realiza reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) usando cebadores de sentido directo que se hibridan con secuencias de la región variable, por ejemplo, cebadores degenerados que reconocen la mayoría o todas de las regiones FR1 de los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humanos y cebadores de sentido contrario que se hibridan con secuencias de región constante o de unión. Entonces se clonan los ADNc de los dominios variables de la cadena pesada y ligera y se expresan en cualquier célula hospedadora adecuada como anticuerpos quiméricos con regiones constantes de inmunoglobulina respectivas, tales como la cadena pesada y dominios constantes de la cadena ligera κ o λ . Véase Babcook, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48, 1996. Los anticuerpos anti-ErbB2 pueden entonces identificarse y aislarse como se describe en el presente documento.

25 Pueden usarse técnicas de presentación en fagos para proporcionar bibliotecas que contienen un repertorio de anticuerpos con afinidades variables por ErbB2. Para la producción de tales repertorios, no es necesario immortalizar los linfocitos B del animal inmunizado. Más bien, pueden usarse linfocitos B primarios directamente como fuente de ADN. Se usa mezcla de ADNc obtenidos de linfocito B, por ejemplo, derivado de sangre o bazo, para preparar una biblioteca de expresión, por ejemplo, una biblioteca de presentación en fagos humana transfectada en *E. coli*. Las células resultantes se prueban para inmunorreactividad para ErbB2. Técnicas de identificación de anticuerpos humanos de alta afinidad de tales bibliotecas se describen por Griffiths et al., EMBO J., 13:3245-3260 (1994); Nissim et al., véase arriba, pp. 692-698 y por Griffiths et al., véase arriba, 12:725-734. Por último lugar, se identifican clones de la biblioteca que producen afinidades de unión de una magnitud deseada por el antígeno y el ADN que codifica el producto responsable de tal unión se recupera y se manipula para expresión recombinante estándar. También pueden construirse bibliotecas de presentación en fagos usando secuencias de nucleótidos previamente manipuladas y se criban de un modo similar. En general, los ADNc que codifican cadenas pesadas y ligeras se suministran independientemente o se unen para formar análogos de Fv para la producción en la biblioteca de fagos. Puede utilizarse barajado de cadenas (véase Kang et al., PNAS (1991) Dec 15;88(24):11120-3).

30 La biblioteca de fagos se criba entonces para los anticuerpos con las afinidades más altas por ErbB2 y el material genético recuperado del clon apropiado. Rondas adicionales de cribado pueden aumentar la afinidad del anticuerpo original aislado.

35 Ácidos nucleicos, vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes de preparación de anticuerpos

Ácidos nucleicos

40 También se divulgan moléculas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-ErbB2 o porciones de unión al antígeno de los mismos. En algunos casos, diferentes moléculas de ácidos nucleicos pueden codificar una cadena pesada y una cadena ligera de una inmunoglobulina anti-ErbB2. En otros casos, la misma molécula de ácido nucleico puede codificar una cadena pesada y una cadena ligera de una inmunoglobulina anti-ErbB2. En otro caso descrito en el presente documento, el ácido nucleico codifica un anticuerpo contra ErbB2 descrito en el presente documento.

La molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera (V_L) pueden utilizar un gen humano B3 de V_K , L1 de V_K , A2 de V_K o A1 de V_K , y un gen Jk1, Jk3, Jk4 o Jk5 con o sin mutación de la línea germinal.

5 La molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 sustituciones y/o 0, 1 o 2 inserciones con respecto a la(s) secuencia(s) de aminoácidos de la línea germinal. La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de V_L que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 13 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de hasta 3 sustituciones no conservativas en comparación con las secuencias de V_K y J_K de la línea germinal. Las sustituciones pueden ser en las regiones CDRs, las regiones estructurales, o en el dominio constante.

15 La molécula de ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos de V_L que comprende una o más variantes en comparación con la secuencia de la línea germinal que son idénticas a las variaciones encontradas en V_L de uno cualquiera de los anticuerpos 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3.

20 La molécula de ácido nucleico puede codificar al menos tres sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal encontrada en V_L de uno de los anticuerpos 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3.

25 La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de V_L del anticuerpo monoclonal 1.44.1 (SEQ ID NO:4), 1.140 (SEQ ID NO:8), 1.43.1 (SEQ ID NO:12), 1.14.1 (SEQ ID NO:16), 1.100.1 (SEQ ID NO:20), 1.96.2 (SEQ ID NO:24), 1.18.1 (SEQ ID NO:28), 1.20.1 (SEQ ID NO:32), 1.39.1 (SEQ ID NO:36), 1.24.3 (SEQ ID NO:40) 1.71.3 (SEQ ID NO:44), o una variante o porción del mismo. El ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprenden las CDRs de cadena ligera de uno de dichos anticuerpos enumerados anteriormente.

30 La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 o 44. En algunos casos preferidos, la molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, o una porción de la misma.

35 El ácido nucleico puede codificar la secuencia de aminoácidos de las CDRs de cadena ligera de dicho anticuerpo.

40 La molécula de ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos de V_L que es al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de V_L de una región V_L de uno cualquiera de los anticuerpos 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3, o una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 o 44. Moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento incluyen ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones altamente rigurosas, tales como aquellos descritos anteriormente, con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una región V_L encontrada en SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, o que tiene la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico que codifica la región V_L encontrada en SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39 o 43.

50 El ácido nucleico puede codificar una cadena ligera de longitud completa de un anticuerpo seleccionado de 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.31.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3.

55 La molécula de ácido nucleico puede codificar el dominio variable de una cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia de los genes V_H 3-21 humano, V_H 3-7 humano, V_H 4-31 humano o V_H 3-13 humano o una secuencia derivada de la misma. La molécula de ácido nucleico puede utilizar un gen V_H 3-7 humano y un J_H6 humano; un gen V_H4 -31 humano, un gen D3-10 humano y un gen J_H6B humano; o un gen V_H3 -13 humano, un gen D6-19 humano y un gen J_H6B humano.

60 La molécula de ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal de los genes V, D y J humanos; 0, 1, 2, o 3 de los cuales pueden ser sustituciones. En algunos casos, dichas mutaciones son en la región V_H . En algunos casos, dichas mutaciones son en las regiones CDRs.

65 La molécula de ácido nucleico puede codificar una o más mutaciones de aminoácido en comparación con la secuencia de la línea germinal que son idénticas a mutaciones de aminoácido encontradas en V_H del anticuerpo monoclonal 1.14.1, 1.18.1, 1.19, 1.20.1, 1.22.1, 1.22.2, 1.24.3, 1.41, 1.43.1, 143.2, 1.44.1, 1.39.1, 1.71.1, 1.71.3, 1.96.2, 1.99, 1.100.1, 1.104, 1.107, 1.124, 1.128, 1.140.1 o 1.148. El ácido nucleico codifica al menos tres

mutaciones de aminoácido en comparación con las secuencias de la línea germinal que son idénticas a al menos tres mutaciones de aminoácido encontradas en uno de los anticuerpos monoclonales enumerados anteriormente.

5 La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una porción de la secuencia de aminoácidos de V_H de un anticuerpo seleccionado de 1.44.1 (SEQ ID NO:2), 1.140.1 (SEQ ID NO:6), 1.43.1 (SEQ ID NO:10), 1.14.1 (SEQ ID NO:14), 1.100.1 (SEQ ID NO:18), 1.96.2 (SEQ ID NO:22), 1.18.1 (SEQ ID NO:26), 1.20.1 (SEQ ID NO:30), 1.39.1 (SEQ ID NO:34), 1.24.3 (SEQ ID NO:38), 1.71.3 (SEQ ID NO:42), una variante del mismo, o dicha secuencia que tiene mutaciones de aminoácido conservativas y/o un total de tres o
10 menos sustituciones de aminoácidos no conservativas. La secuencia puede codificar una o más regiones CDRs, preferentemente una región CDR3, las tres regiones CDRs, o la región V_H entera.

15 La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 y 42. La molécula de ácido nucleico puede comprender al menos una porción de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 o 41. En algunos casos, dicha porción puede codificar la región V_H , una región CDR3 o las tres regiones CDRs.

20 La molécula de ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos de V_H que es al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de V_H de una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 o 42. Moléculas de ácidos nucleicos descritos en el presente documento incluyen ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones altamente rigurosas, tales como aquellas descritos anteriormente, con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 o 41, o con una región V_H de la misma, o que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 o 41 o que codifica una región V_H de la misma.

25 El ácido nucleico puede codificar una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo seleccionado de 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3.

30 Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-ErbB2 o porciones del mismo puede aislarse de cualquier fuente que produzca tal anticuerpo. Las moléculas de ácidos nucleicos pueden aislarse de un linfocito B aislado de un animal inmunizado con ErbB2, de una célula inmortalizada derivada de un linfocito B tal que expresa un anticuerpo anti-ErbB2, o de un bacteriófago. Métodos de aislamiento de ARNm que codifica un anticuerpo son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. El ARNm puede usarse para producir ADNc para su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o clonación de ADNc de genes de anticuerpo. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede aislarse de un hibridoma que tiene como uno de sus
35 componentes de fusión una célula productora de inmunoglobulina humana de un animal transgénico no humano. La célula productora de inmunoglobulina humana puede aislarse de un animal XENOMOUSE™. Alternativamente, la célula productora de inmunoglobulina humana puede ser de un animal transgénico no ratón no humano, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el ácido nucleico puede aislarse de un animal transgénico no ratón no humano. Las moléculas de ácidos nucleicos aisladas de un animal transgénico no ratón no humano pueden usarse, por
40 ejemplo, para anticuerpos humanizados. En otros casos, el ácido nucleico puede aislarse de bacteria o fago.

45 Un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_H como se ha descrito en el presente documento unido en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de la cadena pesada de cualquier fuente. Similarmente, una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_L como se ha descrito en el presente documento unido en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de la cadena ligera de cualquier fuente.

50 En un aspecto adicional, moléculas de ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de las cadenas pesadas (V_H) y/o ligeras (V_L) se "convierten" en genes de anticuerpo de longitud completa. Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los dominios V_H o V_L pueden convertirse en genes de anticuerpo de longitud completa por inserción en un vector de expresión que ya codifica dominios constantes de cadena pesada (C_H) o constantes de cadena ligera (C_L), respectivamente, de forma que el segmento V_H esté operativamente unido al (a los) segmento(s) C_H dentro del vector, y/o el segmento V_L esté operativamente unido al segmento C_L dentro del vector. Moléculas de ácidos nucleicos que codifican los dominios V_H y/o V_L pueden convertirse en genes de anticuerpo de longitud completa por
55 unión, por ejemplo, ligando, una molécula de ácido nucleico que codifica dominios V_H y/o V_L con una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio C_H y/o C_L usando técnicas de biología molecular estándar. Se conocen en la técnica secuencias de nucleótidos de genes de dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana. Véase, por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., NIH Publ. No. 91-3242, 1991. Moléculas de ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa pueden entonces expresarse a partir de una célula en la que se han introducido y aislado el anticuerpo anti-ErbB2.

65 Las moléculas de ácidos nucleicos pueden usarse para expresar recombinantemente grandes cantidades de anticuerpos anti-ErbB2. Las moléculas de ácidos nucleicos también pueden usarse para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monocatenarios, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos

mutados y derivados de anticuerpo, como se describe adicionalmente más adelante. Si las moléculas de ácidos nucleicos se derivan de un animal no transgénico no humano, las moléculas de ácidos nucleicos pueden usarse para la humanización de anticuerpos, también como se describe más adelante.

5 Una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento puede usarse como una sonda o cebador de PCR para una secuencia de anticuerpo específico. Por ejemplo, el ácido nucleico puede usarse como una sonda en métodos de diagnóstico o como un cebador de PCR para amplificar regiones de ADN que podrían usarse, entre otras cosas, para aislar moléculas de ácidos nucleicos adicionales que codifican dominios variables de anticuerpos anti-ErbB2. Las moléculas de ácidos nucleicos pueden ser oligonucleótidos. Los oligonucleótidos pueden ser de dominios altamente variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo de interés. En algunos casos, los oligonucleótidos codifican toda o una parte de una o más de las CDRs de los anticuerpos 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3 (o variantes de los mismos como se describe en el presente documento).

15 *Vectores*

También se describen en el presente documento vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada de un anticuerpo anti-ErbB2 como se ha descrito en el presente documento o una porción de unión al antígeno del mismo, moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera de tales anticuerpos o porción de unión al antígeno de los mismos, o ambos o un agente de unión dirigido. También se describen vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpos, y sondas de los mismos.

Los anticuerpos anti-ErbB2 o porciones de unión al antígeno descritos en el presente documento pueden expresarse insertando ADNs que codifican cadenas ligeras y/o pesadas de longitud parcial o completa, obtenidos como se ha descrito anteriormente, en vectores de expresión de forma que los genes se unan operativamente a secuencias de control de la expresión necesarias tal como secuencias de control transcripcionales y traduccionales. Vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), virus de planta tales como virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco, cósmidos, YACs, episomas derivados de VEB, y similares. El gen de anticuerpo se une en un vector de forma que las secuencias de control transcripcionales y traduccionales dentro del vector sirven para su función prevista de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para ser compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. La cadena ligera del gen de anticuerpo y la cadena pesada del gen de anticuerpo pueden insertarse en vectores separados. Ambos genes pueden insertarse en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos convencionales (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen de anticuerpo y vector, o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción).

Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina de C_H o C_L humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados manipulados de manera que cualquier secuencia de V_H o V_L pueda insertarse y expresarse fácilmente, como se ha descrito anteriormente. En tales vectores, el corte y empalme normalmente se produce entre el sitio donante de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme que precede al dominio C humano, y también en las regiones de corte y empalme que se producen dentro de los exones de C_H humanos. La poliadenilación y terminación de la transcripción se producen en sitios cromosómicos nativos en la dirección 3' de las regiones codificantes. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula hospedadora. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de forma que el péptido señal se una en marco al extremo amino de la cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no de inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes descritos en el presente documento pueden llevar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula hospedadora. Se apreciará por aquellos expertos en la materia que el diseño del vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que va a transformarse, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células hospedadoras de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de LTRs retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador del CMV), virus 40 simio (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP)), polioma y promotores de mamífero fuertes tales como inmunoglobulina nativa y promotores de actina. Para una descripción adicional de elementos reguladores virales, y secuencias de los mismos, véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.168.062, la patente de EE.UU. N.º 4.510.245 y la patente de EE.UU. N.º 4.968.615. Se conocen en la técnica métodos de expresión de anticuerpos en plantas, que incluyen una descripción de promotores y vectores, además de transformación de plantas. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.517.529. También son muy conocidos en la técnica métodos de expresión de polipéptidos en células bacterianas o células fúngicas, por ejemplo, células de levadura.

Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes descritos en el presente documento pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, normalmente el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación con metotrexato), el gen neo (para selección de G418) y el gen glutamato sintetasa.

Células hospedadoras no de híbrido y métodos de producción recombinante de proteína

Pueden usarse moléculas de ácidos nucleicos que codifican agente de unión dirigido y/o anticuerpos anti-ErbB2 y vectores que comprenden estas moléculas de ácidos nucleicos para la transfección de una célula hospedadora de mamífero, planta, bacteriana o de levadura adecuada. La transformación puede ser por cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora. Métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son muy conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, fusión de protoplastos por transfección mediada por polibreno, electroporación, encapsulación de polinucleótido(s) en liposomas y microinyección directa del ADN en los núcleos. Además, pueden introducirse moléculas de ácidos nucleicos en células de mamífero por vectores virales. Métodos de transformación de células son muy conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455). Métodos de transformación de células vegetales son muy conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Métodos de transformación de células bacterianas y de levadura también son muy conocidos en la técnica.

Líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadores para la expresión son muy conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Éstas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células N50, células SP2, células HEK-293T, células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549, y varias otras líneas celulares. Líneas celulares de particular preferencia se seleccionan mediante la determinación de qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insecto, tales como células Sf9 o Sf21. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo se introducen en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que las células hospedadoras se cultivan. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales. Células hospedadoras de planta incluyen, por ejemplo, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja de agua, maíz, trigo, patata, etc. Células hospedadoras bacterianas incluyen especies de *E. coli* y de *Streptomyces*. Células hospedadoras de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Además, la expresión de los anticuerpos descritos en el presente documento a partir de líneas celulares de producción puede potenciarse usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para potenciar la expresión bajo ciertas condiciones. El sistema GS se trata por completo o en parte a propósito de las patentes europeas N.º 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 y 0 338 841.

Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan diferente glucosilación entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento, o que comprenden las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento forman parte de la presente divulgación, independientemente de la glucosilación de los anticuerpos.

Animales y plantas transgénicos

También pueden producirse transgénicamente anticuerpos anti-ErbB2 descritos en el presente documento mediante la generación de un mamífero o planta que es transgénico para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable de las mismas. A propósito de la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos anti-ErbB2 pueden producirse en, y recuperarse de, leche de cabras, vacas, u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172 y 5.741.957. Los animales transgénicos no humanos que comprenden loci de inmunoglobulina humana pueden inmunizarse con ErbB2 o una porción inmunogénica de la misma, como se ha descrito anteriormente. Métodos de preparación de anticuerpos en plantas se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 6.046.037 y 5.959.177.

Pueden producirse animales transgénicos no humanos o plantas introduciendo una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento en el animal o planta por técnicas transgénicas estándar. Véase Hogan y la patente de Estados Unidos 6.417.429, arriba. Las células transgénicas usadas para la preparación del animal transgénico pueden ser células madre embrionarias o células somáticas o un óvulo fecundado. Los organismos no humanos transgénicos pueden ser heterocigotos quiméricos, no quiméricos y homocigotos no quiméricos. Véanse, por ejemplo, Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et al., *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); y Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (1999). Los animales no humanos transgénicos pueden tener una alteración y sustitución dirigida por una construcción de direccionamiento que codifica una cadena pesada y/o una cadena ligera de interés. Los animales transgénicos pueden comprender y expresar moléculas de ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras que se unen específicamente a ErbB2, preferentemente ErbB2 humana. Los animales transgénicos pueden comprender moléculas de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo modificado tal como un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos anti-ErbB2 pueden prepararse en cualquier animal transgénico. Los animales no humanos pueden ser ratones, ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos. El animal transgénico no humano expresa dichos polipéptidos codificados en sangre, leche, orina, saliva, lágrimas, moco y otros fluidos corporales.

Bibliotecas de presentación en fagos

En el presente documento se describe un método de producción de un anticuerpo anti-ErbB2 o una porción de unión al antígeno del mismo que comprende las etapas de sintetizar una biblioteca de anticuerpos humanos en fago, cribar la biblioteca con ErbB2 o una porción de la misma, aislar fago que se une a ErbB2, y obtener el anticuerpo del fago. A modo de ejemplo, un método de preparación de la biblioteca de anticuerpos para su uso en las técnicas de presentación en fagos comprende las etapas de inmunizar un animal no humano que comprende loci de inmunoglobulina humana con ErbB2 o una porción antigénica de la misma para crear una respuesta inmunitaria, extraer células productoras de anticuerpo del animal inmunizado; aislar ARN que codifica cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos descritos en el presente documento de las células extraídas, transcribir de forma inversa el ARN para producir ADNc, amplificar el ADNc usando cebadores e insertar el ADNc en un vector de presentación en fagos de forma que los anticuerpos se expresen en el fago. De esta forma pueden obtenerse los anticuerpos anti-ErbB2 recombinantes descritos en el presente documento.

Pueden aislarse anticuerpos anti-ErbB2 humanos recombinantes descritos en el presente documento por cribado de una biblioteca combinatoria recombinante de anticuerpo. Preferentemente, la biblioteca es una biblioteca de presentación en fagos de scFv, generada usando ADNcs de V_L y V_H humanos preparados a partir de ARNm aislado de linfocitos B. Métodos de preparación y cribado de tales bibliotecas se conocen en la técnica. Kits para generar bibliotecas de presentación en fagos están comercialmente disponibles (por ejemplo, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catálogo N.º 27-9400-01; y el kit de presentación en fagos Stratagene SurfZAP™, catálogo N.º 240612). También hay otros métodos y reactivos que pueden usarse en la generación y el cribado de bibliotecas de presentación de anticuerpos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.223.409; publicaciones PCT N.º WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al., *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibody. Hybridomas* 3:81-85 (1992); Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992); Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., *Bio/Technology* 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137 (1991); y Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982 (1991).

Para aislar y producir anticuerpos anti-ErbB2 humanos con las características deseadas, un anticuerpo anti-ErbB2 humano como se describe en el presente documento puede usarse primero para seleccionar secuencias de cadena pesada y ligera humana que tienen actividad de unión similar hacia ErbB2, usando los métodos de impresión de epítopos descritos en la publicación PCT N.º WO 93/06213. Las bibliotecas de anticuerpos usadas en este método son preferentemente bibliotecas de scFv preparadas y cribadas como se describe en la publicación PCT N.º WO 92/01047, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); y Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Las bibliotecas de anticuerpos scFv se criban preferentemente usando ErbB2 humana como antígeno.

Una vez se seleccionan dominios V_L y V_H humanos iniciales, se realizan experimentos de "mezcla y correspondencia", en los que diferentes pares de los segmentos de V_L y V_H inicialmente seleccionados se criban para la unión de ErbB2 para seleccionar combinaciones de pares V_L/V_H preferidas. Adicionalmente, para mejorar además la calidad del anticuerpo, los segmentos de V_L y V_H del (de los) par(es) V_L/V_H preferidos pueden mutarse aleatoriamente, preferentemente dentro de la región CDR3 de V_H y/o V_L , en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración por afinidad de anticuerpos durante una respuesta inmunitaria natural. Esta maduración por afinidad *in vitro* puede llevarse a cabo amplificando dominios V_H y V_L usando cebadores de PCR complementarios a CDR3 de V_H o CDR3 de V_L , respectivamente, cebadores que han sido "enriquecidos" con una mezcla al azar de las cuatro bases de nucleótidos en ciertas posiciones de forma que los productos de PCR resultantes codifiquen segmentos de V_H y V_L en los que se han introducido mutaciones al azar

en las regiones CDR3 de V_H y/o V_L . Estos segmentos de V_H y V_L mutados al azar pueden volver a cribarse para unirse a ErbB2.

Tras el cribado y aislamiento de un anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento a partir de una biblioteca de presentación de inmunoglobulinas recombinantes, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo seleccionado pueden recuperarse del paquete de presentación (por ejemplo, del genoma de fago) y subclonarse en otros vectores de expresión por técnicas de ADN recombinante convencionales. Si se desea, el ácido nucleico puede manipularse además para crear otras formas de anticuerpo, como se describe más adelante. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado por cribado de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en células hospedadoras de mamífero, como se ha descrito anteriormente.

Conmutación de clase

También se describe en el presente documento un método de conversión de la clase o subclase de un anticuerpo anti-ErbB2 en otra clase o subclase. Una molécula de ácido nucleico que codifica V_L o V_H que no incluye secuencias que codifican C_L o C_H puede aislarse usando métodos muy conocidos en la técnica. La molécula de ácido nucleico se une entonces operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica C_L o C_H de una clase o subclase de inmunoglobulina deseada. Esto puede lograrse usando un vector o molécula de ácido nucleico que comprende una cadena de C_L o C_H , como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-ErbB2 que era originalmente IgM puede cambiarse de clase a IgG. Además, la conmutación de clase puede usarse para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Otro método de producción de un anticuerpo como se ha descrito en el presente documento que comprende un isotipo deseado puede comprender las etapas de aislar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-ErbB2 y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-ErbB2, aislar la secuencia que codifica la región V_H , ligar la secuencia de V_H a una secuencia que codifica un dominio constante de la cadena pesada del isotipo deseado, expresar el gen de cadena ligera y la construcción de cadena pesada en una célula, y recoger el anticuerpo anti-ErbB2 con el isotipo deseado.

Anticuerpos desinmunizados

El anticuerpo puede desinmunizarse para reducir su inmunogenicidad usando las técnicas descritas en, por ejemplo, las publicaciones PCT N.º WO98/52976 y WO00/34317.

Anticuerpos mutados

Pueden usarse las moléculas de ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras para preparar anticuerpos anti-ErbB2 mutados. Los anticuerpos pueden mutarse en los dominios variables de las cadenas pesadas y/o ligeras, por ejemplo, para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, puede hacerse una mutación en una o más de las regiones CDRs para aumentar o disminuir la K_D del anticuerpo para ErbB2, para aumentar o disminuir K_{dis} , o para alterar la especificidad de unión del anticuerpo. Técnicas en mutagénesis dirigida al sitio son muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. y Ausubel et al., arriba. Pueden hacerse una o más mutaciones en un resto de aminoácido que se sabe que cambia en comparación con la línea germinal en el anticuerpo 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3. Las mutaciones pueden hacerse en una región CDR o región estructural de un dominio variable, o en un dominio constante. En otra realización, las mutaciones se hacen en un dominio variable. Pueden hacerse una o más mutaciones en restos de aminoácidos que son conocidos por cambiarse en comparación con la línea germinal en una región CDR o región estructural de un dominio variable de una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 y 44, o cuya secuencia de nucleótidos se presenta en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43.

La región estructural puede mutarse de manera que la(s) región (regiones) estructural(es) resultante(s) tenga(n) la secuencia de aminoácidos del gen de la línea germinal correspondiente. Una mutación puede hacerse en una región estructural o dominio constante para aumentar la semivida del anticuerpo anti-ErbB2. Véase, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 00/09560. También puede hacerse una mutación en una región estructural o dominio constante para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, para proporcionar un sitio para unión covalente o no covalente a otra molécula, o para alterar tales propiedades como fijación del complemento, unión de FcR y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Un único anticuerpo puede tener mutaciones en una cualquiera o más de las CDRs o regiones estructurales del dominio variable o en el dominio constante.

Puede haber de 1 a 8, que incluye cualquier número intermedio, mutaciones de aminoácido en tanto los dominios V_H como V_L del anticuerpo anti-ErbB2 mutado en comparación con el anticuerpo anti-ErbB2 antes de la mutación. En cualquiera de los anteriores, las mutaciones pueden producirse en una o más regiones CDRs. Además, cualquiera de las mutaciones puede ser sustituciones de aminoácidos conservativas. Puede haber no más de 5, 4, 3, 2 o 1 cambios de aminoácido en los dominios constantes.

Anticuerpos modificados

Puede prepararse un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina que comprende toda o una porción de un anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento unido a otro polipéptido. Alternativamente, solo los dominios variables del anticuerpo anti-ErbB2 se unen al polipéptido. El dominio V_H de un anticuerpo anti-ErbB2 puede unirse a un primer polipéptido, mientras que el dominio V_L de un anticuerpo anti-ErbB2 puede unirse a un segundo polipéptido que se asocia al primer polipéptido de un modo tal que los dominios V_H y V_L puedan interactuar entre sí para formar un sitio de unión al antígeno. El dominio V_H puede separarse del dominio V_L por un conector tal que los dominios V_H y V_L puedan interactuar entre sí (véase más adelante en Anticuerpos monocatenarios). El anticuerpo V_H -conector- V_L se une entonces al polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido a una célula o tejido que expresa ErbB2. El polipéptido puede ser un agente terapéutico, tal como una toxina, factor de crecimiento u otra proteína reguladora, o puede ser un agente de diagnóstico, tal como una enzima que puede ser fácilmente visualizada, tal como peroxidasa de rábano picante. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los que dos (o más) anticuerpos monocatenarios se unen el uno al otro. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una única cadena de polipéptidos, o si se quiere crear un anticuerpo biespecífico.

Para crear un anticuerpo monocatenario, (scFv), los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se unen operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos $(Gly_4-Ser)_3$, de forma que las secuencias V_H y V_L puedan expresarse como una proteína de cadena única contigua, con los dominios V_L y V_H unidos por el conector flexible. Véanse, por ejemplo, Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990). El anticuerpo monocatenario puede ser monovalente, si solo se usa una única V_H y V_L , bivalente, si se usan dos V_H y V_L , o polivalente, si se usan más de dos V_H y V_L . Pueden generarse anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se unen específicamente a ErbB2 y a otra molécula.

Pueden prepararse otros anticuerpos modificados usando moléculas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-ErbB2. Por ejemplo, pueden prepararse "cuerpos Kappa" (Ill et al., *Protein Eng.* 10: 949-57 (1997)), "Minicuerpos" (Martin et al., *EMBO J.* 13: 5303-9 (1994)), "Diacuerpos" (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)), o "Janusinas" (Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) y Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992)) usando técnicas de biología molecular estándar siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva.

Pueden producirse anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno mediante una variedad de métodos que incluyen fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véanse, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992). Además, pueden formarse anticuerpos biespecíficos como "diacuerpos" o "Janusinas". El anticuerpo biespecífico puede unirse a dos epítopes de ErbB2 diferentes. El anticuerpo biespecífico puede tener una primera cadena pesada y una primera cadena ligera del anticuerpo 1.44.1, 1.140, 1.43, 1.14.1, 1.100.1, 1.96, 1.18.1, 1.20, 1.39, 1.24 y 1.71.3 y una cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo adicionales. La cadena ligera y cadena pesada adicionales también pueden ser de uno de los anticuerpos monoclonales anteriormente identificados, pero pueden ser diferentes de la primera cadena pesada y ligera.

Los anticuerpos modificados descritos anteriormente pueden prepararse usando uno o más de los dominios variables o regiones CDRs de un anticuerpo anti-ErbB2 monoclonal humano proporcionado en el presente documento.

Los anticuerpos descritos en el presente documento también engloban anticuerpos que tienen semividas (por ejemplo, semividas en suero) en un mamífero, preferentemente un ser humano, de más de aquellas de un anticuerpo no modificado. Dicha semivida del anticuerpo puede ser superior a aproximadamente 15 días, superior a aproximadamente 20 días, superior a aproximadamente 25 días, superior a aproximadamente 30 días, superior a aproximadamente 35 días, superior a aproximadamente 40 días, superior a aproximadamente 45 días, superior a aproximadamente 2 meses, superior a aproximadamente 3 meses, superior a aproximadamente 4 meses, o superior a aproximadamente 5 meses. Las elevadas semividas de los anticuerpos descritos en el presente documento o fragmentos de los mismos en un mamífero, preferentemente un ser humano, producen un título más alto del suero de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en el mamífero, y así, reducen la frecuencia de administración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y/o reducen la concentración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que van a administrarse. Pueden generarse anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen elevadas semividas *in vivo* por técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos o fragmentos de los mismos con elevadas semividas *in vivo* modificando (por ejemplo, sustituyendo, delecionando o añadiendo) restos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn (véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales WO 97/34631 y WO 02/060919). Pueden generarse anticuerpos o fragmentos de los mismos con elevadas semividas *in vivo* uniendo a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos moléculas de polímero tales como polietilenglicol de alto peso molecular (PEG). PEG puede unirse a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con o sin un conector multifuncional tanto mediante conjugación específica de sitio del PEG al extremo N o C de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos como mediante grupos épsilon-amino presentes en restos de lisina. Se usará

derivatización de polímero lineal o ramificado que produce pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación será estrechamente monitorizado por SDS-PAGE y espectrometría de masas para garantizar la apropiada conjugación de moléculas de PEG con los anticuerpos. Puede separarse PEG sin reaccionar de los conjugados anticuerpo-PEG por, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico.

Puede proporcionarse un sitio de unión al antígeno por medio de la disposición de CDRs sobre armazones de proteína no de anticuerpo, tales como fibronectina o citocromo B, etc. (Haan & Maggos (2004) *BioCentury*, 12(5): A1-A6; Koide et al. (1998) *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151; Nygren et al. (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463-469) o por aleatorización o mutación de restos de aminoácidos de un bucle dentro de un armazón de proteína para conferir especificidad de unión por una diana deseada. Los armazones para manipular sitios de unión novedosos en proteínas han sido revisados en detalle por Nygren et al. (Nygren et al. (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463-469). Los armazones de proteína para miméticos de anticuerpo se desvelan en el documento WO/0034784, en el que los inventores describen proteínas (miméticos de anticuerpo) que incluyen un dominio de fibronectina tipo III que tiene al menos un bucle al azar. Un armazón adecuado en el que injertar una o más CDRs, por ejemplo, un conjunto de HCDRs, puede ser proporcionado por cualquier miembro del dominio de la superfamilia de genes de inmunoglobulina. El armazón puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de un armazón de proteína no de anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de unión al antígeno en una molécula de armazón que es más pequeña y/o más fácil de fabricar que al menos algunas moléculas de anticuerpo. El pequeño tamaño de un miembro de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles, tales como una capacidad para entrar en células, penetrar profundo en tejidos o llegar a dianas dentro de otras estructuras, o de unirse dentro de cavidades de proteína del antígeno diana. El uso de sitios de unión al antígeno en armazones de proteína no de anticuerpo se revisa en Wess, 2004 (Wess, L. en: *BioCentury*, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004). Son típicas proteínas que tienen un esqueleto estable y uno o más bucles variables, en los que la secuencia de aminoácidos del bucle o el bucle está específicamente o aleatoriamente mutado para crear un sitio de unión al antígeno que se une el antígeno diana. Tales proteínas incluyen los dominios de unión a IgG de proteína A de *S. aureus*, transferrina, albúmina, tetranectina, fibronectina (por ejemplo, 10° dominio de fibronectina tipo III), lipocalinas además de gamma-cristalina y otros armazones de Affilin™ (Scil Proteins). Ejemplos de otros enfoques incluyen "Microcuerpos" sintéticos basados en ciclotidas - proteínas pequeñas que tienen enlaces disulfuro intra-moleculares, Microproteínas (Versabodies™, Amunix) y proteínas de repetición de anquirina (DARPs, Molecular Partners).

Además de secuencias de anticuerpos y/o un sitio de unión al antígeno, un agente de unión dirigido como se ha descrito en el presente documento puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, que forman un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para conferir a la molécula otra característica funcional, además de capacidad para unirse al antígeno. Agentes de unión dirigidos como se han descrito en el presente documento pueden llevar una marca detectable, o pueden conjugarse con una toxina o un resto de direccionamiento o enzima (por ejemplo, mediante un enlace o conector de peptidilo). Por ejemplo, un agente de unión dirigido puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático), además de un sitio de unión al antígeno, en el que el sitio de unión al antígeno se une al antígeno y así dirige el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo por escisión.

Anticuerpos derivatizados y marcados

Un anticuerpo anti-ErbB2 o porción de unión al antígeno descrito en el presente documento puede derivatizarse o unirse a otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o porción de los mismos se derivatizan de forma que la unión de ErbB2 no se afecte adversamente por la derivatización o marcado. Por consiguiente, los anticuerpos y porciones de anticuerpo de los mismos como se han descrito en el presente documento pretenden incluir tanto formas intactas como modificadas de los anticuerpos anti-ErbB2 humanos descritos en el presente documento. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo del mismo como se ha descrito en el presente documento puede unirse funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o varias de otras entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o una marca de polihistidina).

Se produce un tipo de anticuerpo derivatizado reticulando dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos distintos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Tales conectores están disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Otro tipo de anticuerpo derivatizado es un anticuerpo marcado. Agentes de detección útiles con los que un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo como se han descrito en el presente documento pueden derivatizarse incluyen compuestos fluorescentes, que incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantánidos y similares. Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que son útiles para la detección, tal como peroxidasa de rábano picante, β -

galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se marca con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que puede ser distinguido. Por ejemplo, cuando el agente peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede marcarse con biotina, y detectarse mediante medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Un anticuerpo también puede marcarse con un epítipo de polipéptido predeterminado reconocido por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metal, marcas de epítopes). En algunos casos, las marcas pueden unirse por brazos de espaciador de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

Un anticuerpo anti-ErbB2 también puede marcarse con un aminoácido radiomarcado. La radiomarca puede usarse para tanto fines de diagnóstico como terapéuticos. Por ejemplo, la radiomarca puede usarse para detectar células que expresan ErbB2 por rayos X u otras técnicas de diagnóstico. Además, la radiomarca puede usarse terapéuticamente como una toxina para células que expresan ErbB2, tales como aquellas que producen respuesta inmunitaria no deseada. Ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes radioisótopos o radionúclidos: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I y ^{131}I .

El anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento puede marcarse con un ión paramagnético, radiactivo o fluorogénico que es detectable tras la obtención de imágenes. El ión paramagnético puede ser cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) o erbio (III). El ión radiactivo puede ser yodo 123, tecnecio 99, indio 111, renio 188, renio 186, cobre 67, yodo 131, itrio 90, yodo 125, astato 211 y galio 67. El anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento puede marcarse con un agente de obtención de imágenes de rayos X tal como lantano (III), oro (III) plomo (II) y bismuto (III).

Un anticuerpo anti-ErbB2 también puede derivatizarse con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo hidrato de carbono. Estos grupos son útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero o para aumentar la unión al tejido.

Composiciones farmacéuticas y kits

En el presente documento se describen composiciones que comprenden un agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 humano como se han descrito en el presente documento con propiedades antagonistas para el uso en el tratamiento de sujetos en necesidad de un procedimiento terapéutico que incluye, pero no se limita a, aquellos afectados con cáncer. El sujeto de tratamiento puede ser un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un sujeto veterinario.

El tratamiento puede implicar la administración de uno o más anticuerpos anti-ErbB2 monoclonales inhibidores descritos en el presente documento, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, solos o con una barrera farmacéuticamente aceptable. Anticuerpos anti-ErbB2 inhibidores descritos en el presente documento y composiciones que los comprenden pueden administrarse en combinación con uno o varios de otros agentes terapéuticos, de diagnóstico o profilácticos.

Los agentes terapéuticos de la divulgación pueden incluir agentes antineoplásicos. Agentes antineoplásicos incluyen, sin limitación, agentes basados en platino, tales como carboplatino y cisplatino; agentes alquilantes de mostaza de nitrógeno; agentes alquilantes de nitrosourea, tales como carmustina (BCNU) y otros agentes alquilantes; antimetabolitos, tales como metotrexato; antimetabolitos de análogos de purina; antimetabolitos de análogos de pirimidina, tales como fluorouracilo (5-FU) y gemcitabina; antineoplásicos hormonales, tales como goserelina, leuprolida y tamoxifeno; antineoplásicos naturales, tales como taxanos (por ejemplo, docetaxel y paclitaxel), aldesleucina, interleucina-2, etopósido (VP-16), interferón alfa y tretinoína (ATRA); antineoplásicos naturales de antibiótico, tales como bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina y mitomicina; y antineoplásicos naturales de alcaloides de la vinca, tales como vinblastina y vincristina.

El agente antineoplásico puede ser 5-fluoruracilo, 6-mercaptopurina, actinomicina, Adriamycin®, Aducil®, aminoglutetimida, anastrozol, Aredia®, Arimidex®, Aromasin®, Bonefos®, bleomicina, carboplatino, cactinomicina, capecitabina, cisplatino, clodronato, ciclofosfamida, Cytadren®, Cytoxan®, dactinomicina, docetaxel, Doxyl®, doxorubicina, epirubicina, etopósido, exemestano, Femara®, fluorouracilo, fluoximesterona, Halotestin®, Herceptin®, letrozol, leucovorina cálcica, Megace®, acetato de megestrol, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, Mutamycin®, Navelbine®, Nolvadex®, Novantrone®, Oncovin®, Ostac®, paclitaxel, pamidronato, Pharmorubicin®, Platinol®, prednisona, Procytox®, Tamofen®, Tamone®, Tamoplex®, tamoxifeno, Taxol®, Taxotere®, trastuzumab, tiotepa, Velbe®, Vepesid®, vinblastina, vincristina, vinorelbina, Xeloda®, o una combinación de los mismos.

El agente antineoplásico puede comprender un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario, o un fragmento de un anticuerpo. Anticuerpos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, Rituxan, IDEC-C2B8, anti-CD20 Mab, Panorex, 3622W94, antígeno de pancarcinoma anti-EGP40 (17-1 A) en adenocarcinomas Herceptin®, Erbitux, anti-Her2, Anti-EGFr, BEC2, epítipo anti-GD₃ idiopático,

5 Ovarex, B43.13, anti-CA125 idiopático, 4B5, anti-VEGF, RhuMab, MDX-210, anti-HER2, MDX-22, MDX-220, MDX-447, MDX-260, anti-GD-2, Quadramet, CYT-424, IDEC-Y2B8, Oncolym, Lym-1, SMART M195, ATRAGEN, LDP-03, anti-CAMPATH, ior t6, anti-CD6, MDX-11, OV103, Zenapax, anti-Tac, anti-receptor de IL-2, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMAb-G2, TNT, anti-histona, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, Monopharm-C, anti-FLK-2, SMART 1D10, SMART ABL 364, ImmuRAIT-CEA, o combinaciones de los mismos.

10 El agente antineoplásico puede comprender un tipo adicional de célula tumoral. En casos específicos, el tipo adicional de célula tumoral puede ser una célula MCF-10A, MCF-10F, MCF-10-2A, MCF-12A, MCF-12F, ZR-75-1, ZR-75-30, UACC-812, UACC-893, HCC38, HCC70, HCC202, HCC1007 BL, HCC1008, HCC1143, HCC1187, HCC1187 BL, HCC1395, HCC1569, HCC1599, HCC1599 BL, HCC1806, HCC1937, HCC1937 BL, HCC1954, HCC1954 BL, HCC2157, Hs 274.T, Hs 281.T, Hs 343.T, Hs 362.T, Hs 574.T, Hs 579.Mg, Hs 605.T, Hs 742.T, Hs 748.T, Hs 875.T, MB 157, SW527, 184A1, 184B5, MDA-MB-330, MDA-MB-415, MDA-MB-435S, MDA-MB-436, MDA-MB-453, MDA-MB-468 RT4, BT-474, CAMA-1, MCF7 [MCF-7], MDA-MB-134-VI, MDA-MB-157, MDA-MB-175-VII HTB-27 MDA-MB-361, SK-BR-3 o ME-180, todas las cuales están disponibles de ATTC.

20 El agente antineoplásico puede comprender un reactivo antisentido, tal como un ARNip o una molécula de ARN de horquilla, que reduce la expresión o función de un gen que se expresa en una célula cancerosa. Reactivos antisentido a modo de ejemplo que pueden usarse incluyen aquellos dirigidos a mucina, Ha-ras, VEGFR1 o BRCA1. Tales reactivos se describen en las patentes de EE.UU. N.º 6.716.627 (mucina), 6.723.706 (Ha-ras), 6.710.174 (VEGFR1) y en la publicación de patente de EE.UU. N.º 2004/0014051 (BRCA1).

25 El agente antineoplásico puede comprender células autólogas para el sujeto, tales como células del sistema inmunitario tales como macrófagos, linfocitos T o dendritas. Las células pueden haber sido tratadas con un antígeno, tal como un péptido o un antígeno de cáncer, o haber sido incubadas con células tumorales del paciente. Pueden mezclarse linfocitos de sangre periférica autólogos con células SV-BR-1 y administrarse al sujeto. Tales linfocitos pueden aislarse por leucaféresis. Células autólogas adecuadas que pueden usarse, métodos para su aislamiento, métodos de modificación de dichas células para mejorar su eficacia y formulaciones que comprenden dichas células se describen en las patentes de EE.UU. N.º 6.277.368, 6.451.316, 5.843.435, 5.928.639, 6.368.593 y 6.207.147, y en las publicaciones PCT internacionales N.º WO04/021995 y WO00/57705.

35 En los métodos descritos en el presente documento dirigidos al tratamiento de cáncer, el sujeto puede tratarse antes de, simultáneamente con, o posteriormente al tratamiento con las células descritas en el presente documento, con una terapia complementaria al cáncer, tal como cirugía, quimioterapia, radioterapia, o terapia hormonal o una combinación de las mismas.

40 En casos específicos, donde el cáncer es cáncer de mama, el tratamiento complementario puede comprender cirugía para preservar la mama, es decir, una operación para eliminar el cáncer pero no la mama, también llamada cirugía para preservar la mama, cirugía para conservar la mama, lumpectomía, mastectomía segmentaria o mastectomía parcial. En otro caso, puede comprender una mastectomía. Una mastectomía es una operación para eliminar la mama, o tanto tejido de la mama como sea posible, y en algunos casos también los ganglios linfáticos bajo el brazo. En otro caso más, la cirugía puede comprender biopsia de ganglio linfático centinela, donde solo uno o algunos ganglios linfáticos (los ganglios centinela) se extirpan en lugar de eliminar un número mucho mayor de ganglios linfáticos de debajo del brazo. La cirugía también puede comprender mastectomía radical modificada, donde un cirujano extirpa la mama completa, la mayoría o todos los ganglios linfáticos bajo el brazo, y, frecuentemente, el revestimiento sobre los músculos del tórax. Los más pequeños de los dos músculos del tórax también pueden ser extraídos para facilitar extirpar los ganglios linfáticos.

50 El tratamiento complementario puede comprender radioterapia. La radioterapia puede comprender radiación externa, donde la radiación procede de una máquina, o de radiación interna (radiación de implante, en la que la radiación se origina de material radiactivo dispuesto en tubos de plástico delgado puestos directamente en la mama).

55 El tratamiento complementario puede comprender quimioterapia. Agentes quimioterapéuticos que se encuentra que son de ayuda en la supresión de tumores incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes (por ejemplo, mostazas de nitrógeno), antimetabolitos (por ejemplo, análogos de pirimidina), isótopos radiactivos (por ejemplo, fósforo y yodo), diversos agentes (por ejemplo, ureas sustituidas) y productos naturales (por ejemplo, alcaloides de la vinca y antibióticos). El agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en alopurinol sódico, mesilato de dolasetrón, pamidronato disódico, etidronato, fluconazol, epyetina alfa, HCl de levamisol, amifostina, HCl de granisetron, leucovorina cálcica, sargramostim, dronabinol, mesna, filgrastim, HCl de pilocarpina, acetato de octreotida, dexrazoxano, HCl de ondansetrón, ondansetrón, busulfán, carboplatino, cisplatino, tiotepa, HCl de melfalán, melfalán, ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, HCl de mecloretamina, carmustina, lomustina, polifeprosan 20 con implante de carmustina, estreptozocina, HCl de doxorubicina, sulfato de bleomicina, HCl de daunorubicina, dactinomicina, citrato de daunorubicina, HCl de idarubicina, plimicina, mitomicina, pentostatina, mitoxantrona, valrubicina, citarabina, fosfato de fludarabina, floxuridina, cladribina, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina, capecitabina, metiltestosterona, nilutamida, testolactona, bicalutamida, flutamida, anastrozol, citrato de toremifeno, fosfato sódico de estramustina, etinilestradiol, estradiol, estrógenos esterificados, estrógenos

conjugados, acetato de leuprolida, acetato de goserelina, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, HCl de levamisol, aldesleucina, HCl de irinotecán, dacarbazina, asparaginasa, fosfato de etopósido, HCl de gemcitabina, altretamina, HCl de topotecán, hidroxurea, interferón alfa-2b, mitotano, HCl de procarbazona, tartrato de vinorelbina, L-asparaginasa de *E. coli*, L-asparaginasa de *Erwinia*, sulfato de vincristina, denileucina difitox, aldesleucina, rituximab, interferón alfa-2a, paclitaxel, docetaxel, BCG vivo (intravesical), sulfato de vinblastina, etopósido, tretinoína, tenipósido, porfimer sódico, fluorouracilo, fosfato sódico de betametasona y acetato de betametasona, letrozol, factor citrovórum de etopósido, ácido folínico, leucovorina cálcica, 5-fluorouracilo, adriamicina, citoxano y diaminodicloroplatino, dicho agente de quimioterapia en combinación con timosina- α_1 que se administra en una cantidad eficaz para reducir dichos efectos secundarios de quimioterapia en dicho paciente.

El tratamiento complementario puede comprender terapia hormonal. La terapia hormonal puede comprender el uso de un fármaco, tal como tamoxifeno, que puede bloquear las hormonas naturales como estrógeno o puede comprender inhibidores de la aromatasa que previenen la síntesis de estradiol. La terapia hormonal alternativa puede comprender la extirpación de los ovarios del sujeto, especialmente si el sujeto es una mujer que todavía no ha pasado la menopausia.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, además de combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la estabilidad en almacén o eficacia del anticuerpo.

Las composiciones como se han descrito en el presente documento pueden estar en una variedad de formas, por ejemplo, formas de dosificación líquida, semi-sólida y sólida, tales como soluciones líquidas (*por ejemplo*, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo previsto de administración y la aplicación terapéutica. Composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a aquellas usadas para inmunización pasiva de seres humanos. El modo de administración preferido es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). El anticuerpo puede administrarse por infusión o inyección intravenosa. El anticuerpo puede administrarse por inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el anticuerpo anti-ErbB2 en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. Puede provocarse absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo de administración preferida es infusión subcutánea, intramuscular o intravenosa. Como será apreciado por el experto, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados.

El compuesto activo de composiciones de anticuerpo puede prepararse con un vehículo que protegerá al anticuerpo contra la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulada. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico, quitosano y alginato. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

En el presente documento se describen composiciones adecuadas para administración por inhalación, que pueden comprender los anticuerpos anti-ErbB2 descritos en el presente documento. Los anticuerpos anti-ErbB2 pueden administrarse convenientemente a un sujeto en forma de una presentación de spray en aerosol de envases

presurizados o de un nebulizador, con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Dellamary et al., (2004) J Control Release.,95(3): 489-500 describe formulaciones para la administración pulmonar de anticuerpos.

En el presente documento se describen composiciones, adecuadas para administración a través de la mucosa oral, que pueden comprender el anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento. Administración transmucosa oral se refiere a la administración de un vehículo de administración a través de una membrana mucosa en la cavidad bucal, cavidad faríngea, o esófago, y puede contrastarse, por ejemplo, con administración oral tradicional, en la que la absorción de un fármaco se produce en el intestino. Por consiguiente, vías de administración en las que los anticuerpos anti-ErbB2 se absorben a través de la mucosa bucal, sublingual, gingival, faríngea y/o esofágica están todos englobados dentro de "administración transmucosa oral", como ese término se usa en el presente documento. Para administración a través de la mucosa transmucosa, el anticuerpo anti-ErbB2 puede formularse, por ejemplo, en chicles (véase la patente de EE.UU. N.º 5.711.961) o parches bucales (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.298.256).

En el presente documento se describen composiciones adecuadas para administración a través de la mucosa vaginal, que pueden comprender los anticuerpos anti-ErbB2 descritos en el presente documento. Los anticuerpos anti-ErbB2 descritos en el presente documento pueden formularse en un supositorio vaginal, espuma, crema, comprimido, cápsula, pomada o gel.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-ErbB2 descritos en el presente documento pueden formularse con permeantes apropiados para la barrera transmucosa que va a permearse. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa sales biliares y derivados de ácido fusífico.

Un anticuerpo anti-ErbB2 como se ha descrito en el presente documento puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros componentes, si se desea) también pueden estar encerrados en una cápsula de gelatina de vaina dura o blanda, comprimirse en comprimidos, o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, los anticuerpos anti-ErbB2 pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Puede ser necesario administrar un compuesto descrito en el presente documento por administración distinta de parenteral para recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación.

También pueden incorporarse compuestos activos adicionales en las composiciones. Un anticuerpo anti-ErbB2 inhibidor como se ha descrito en el presente documento puede co-formularse con y/o co-administrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como aquellos enumerados arriba. Tales terapias de combinación pueden requerir dosificaciones más bajas del anticuerpo anti-ErbB2 inhibidor, además de los agentes co-administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas a las diversas monoterapias.

También pueden administrarse anticuerpos anti-ErbB2 inhibidores descritos en el presente documento y composiciones que los comprenden en combinación con otras pautas terapéuticas, en particular en combinación con tratamiento radiológico quirúrgico y/o de quimioterapia.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo como se ha descrito en el presente documento. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o porción de anticuerpo puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo es sobrepasado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, como se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una fase más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz puede ser inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

Pueden ajustarse las pautas de dosificación para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede reducirse o elevarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Forma unitaria de dosificación

como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que van a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación está impuesta por y es directamente dependiente de (a) las características únicas del anticuerpo anti-ErbB2 o porción del mismo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que va a lograrse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de preparación de composiciones tal como un anticuerpo para el tratamiento de sensibilidad en sujetos.

Un intervalo no limitante a modo de ejemplo para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o porción de anticuerpo del mismo como se ha descrito en el presente documento es 0,025 a 50 mg/kg, más preferentemente 0,1 a 50 mg/kg, más preferentemente 0,1 a 25, 0,1 a 10 o 0,1 a 3 mg/kg. Una formulación puede contener 5 mg/ml de anticuerpo en un tampón de citrato de sodio 20 mM, pH 5,5, NaCl 140 mM y 0,2 mg/ml de polisorbato 80. Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que va a aliviarse. Debe entenderse adicionalmente que para cualquier sujeto particular, pautas de dosificación específicas deben ajustarse con el tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son a modo de ejemplo solo y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

En el presente documento se describen kits que comprenden un anticuerpo anti-ErbB2 o porción de anticuerpo del mismo como se ha descrito en el presente documento o una composición que comprende un anticuerpo tal. Un kit puede incluir, además del anticuerpo o composición, agentes de diagnóstico o terapéuticos. Un kit también puede incluir instrucciones para su uso en un método de diagnóstico o terapéutico. El kit puede incluir el anticuerpo o una composición que lo comprende y un agente de diagnóstico que puede usarse en un método descrito a continuación. El kit puede incluir el anticuerpo o una composición que lo comprende y uno o más agentes terapéuticos que pueden usarse en un método descrito a continuación.

Métodos de diagnóstico de uso

En el presente documento se describen métodos de diagnóstico. Los anticuerpos anti-ErbB2 pueden usarse para detectar ErbB2 en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*. En el presente documento se describe un método de diagnóstico de la presencia o localización de células que expresan ErbB2 en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende las etapas de administrar el anticuerpo al sujeto, determinar la expresión de ErbB2 en el sujeto localizando dónde el anticuerpo se ha unido, comparar la expresión en el sujeto con la de un sujeto de referencia normal o patrón, y diagnosticar la presencia o localización de las células. Los anticuerpos anti-ErbB2 también pueden usarse como marcador de proliferación.

Los anticuerpos anti-ErbB2 pueden usarse en un inmunoensayo convencional, que incluye, sin limitación, un ELISA, un RIA, citometría de flujo, inmunohistoquímica de tejido, transferencia Western o inmunoprecipitación. Los anticuerpos anti-ErbB2 descritos en el presente documento pueden usarse para detectar ErbB2 de seres humanos. Los anticuerpos anti-ErbB2 pueden usarse para detectar ErbB2 de monos cinomolgos o monos rhesus. Los anticuerpos anti-ErbB2 pueden usarse para detectar ErbB2 de roedores, tales como ratones y ratas.

En el presente documento se describe un método de detección de ErbB2 en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento y detectar el anticuerpo unido. El anticuerpo anti-ErbB2 puede ser directamente marcado con una marca detectable. Alternativamente, el anticuerpo anti-ErbB2 (el primer anticuerpo) puede estar sin marcar y puede marcarse un segundo anticuerpo u otra molécula que puede unirse al anticuerpo anti-ErbB2. Como es muy conocido para un experto en la materia, se elige un segundo anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a la especie y clase particulares del primer anticuerpo. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-ErbB2 es una IgG humana, entonces el anticuerpo secundario podría ser una anti-IgG humana. Otras moléculas que pueden unirse a anticuerpos incluyen, sin limitación, proteína A y proteína G, ambas de las cuales están comercialmente disponibles, por ejemplo, de Pierce Chemical Co.

Marcas adecuadas para el anticuerpo o anticuerpo secundario se han desvelado arriba, e incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^3H .

Puede ensayarse ErbB2 en una muestra biológica por un inmunoensayo de competición utilizando patrones de ErbB2 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-ErbB2 no marcado. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de ErbB2 marcados y el anticuerpo anti-ErbB2 se combinan y se determina la cantidad de

patrón de ErbB2 marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de ErbB2 en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de ErbB2 marcado unido al anticuerpo anti-ErbB2.

5 Pueden usarse los inmunoensayos desvelados anteriormente para varios fines. Por ejemplo, los anticuerpos anti-ErbB2 pueden usarse para detectar ErbB2 en células cultivadas. Los anticuerpos anti-ErbB2 pueden usarse para determinar la cantidad de ErbB2 sobre la superficie de células que han sido tratadas con diversos compuestos. Este método puede usarse para identificar compuestos que modulan niveles de proteína ErbB2. Según este método, una muestra de células se trata con un compuesto de prueba durante un periodo de tiempo mientras que otra muestra se deja sin tratar. Si va a medirse el nivel total de ErbB2, las células se lisan y el nivel de ErbB2 total se mide usando uno de los inmunoensayos descritos anteriormente. Se compara el nivel total de ErbB2 en las células tratadas frente a las sin tratar para determinar el efecto del compuesto de prueba.

15 Un inmunoensayo preferido para medir niveles de ErbB2 total es citometría de flujo o inmunohistoquímica. Si va a medirse el nivel en la superficie celular de ErbB2, las células no se lisan, y los niveles en la superficie celular de ErbB2 se miden usando uno de los inmunoensayos descritos anteriormente. Un inmunoensayo preferido para determinar niveles en la superficie celular de ErbB2 incluye las etapas de marcar las proteínas de la superficie celular con una marca detectable, tal como biotina o ¹²⁵I, inmunoprecipitar la ErbB2 con un anticuerpo anti-ErbB2 y entonces detectar la ErbB2 marcada.

20 Otro inmunoensayo preferido para determinar la localización de ErbB2, por ejemplo, niveles en la superficie celular, es usar inmunohistoquímica. Un inmunoensayo preferido para detectar niveles en la superficie celular de ErbB2 incluye unir un anticuerpo anti-ErbB2 marcado con un fluoróforo apropiado, tal como fluoresceína o ficoeritrina, y detectar el anticuerpo primario usando citometría de flujo. El anticuerpo anti-ErbB2 puede estar sin marcar y un segundo anticuerpo u otra molécula que puede unirse al anticuerpo anti-ErbB2 puede estar marcado. Métodos tales como ELISA, RIA, citometría de flujo, transferencia Western, inmunohistoquímica, marcado de la superficie celular de proteínas de membrana integral e inmunoprecipitación son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane, arriba. Además, los inmunoensayos pueden aumentarse de escala para cribado de alto rendimiento con el fin de probar un gran número de compuestos para tanto activación como inhibición de ErbB2.

30 Los anticuerpos anti-ErbB2 descritos en el presente documento también pueden usarse para determinar los niveles de ErbB2 en un tejido o en células derivadas de tejido. Los anticuerpos anti-ErbB2 pueden usarse para determinar la infiltración de células que expresan ErbB2 en tejidos que tanto no expresan ErbB2 como que la expresan a niveles reducidos en comparación con las células infiltrantes. En algunos casos, el tejido puede ser un tejido enfermo. En algunos casos, el tejido puede ser una biopsia de tejido. En algunos casos del método, un tejido o una biopsia del mismo pueden escindirse de un sujeto. El tejido o biopsia se usa entonces en un inmunoensayo para determinar, por ejemplo, niveles de ErbB2 total, niveles en la superficie celular de ErbB2 o localización de ErbB2 por los métodos tratados anteriormente. Tales métodos pueden usarse para determinar si un tejido expresa altos niveles de ErbB2, que podría ser indicativo de que el tejido es una diana para el tratamiento con anticuerpo anti-ErbB2.

40 Los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden usarse *in vivo* para identificar tejidos y órganos que expresan ErbB2. Los anticuerpos anti-ErbB2 se usan para identificar células que expresan ErbB2. Una ventaja de uso de los anticuerpos anti-ErbB2 humanos descritos en el presente documento es que pueden usarse de forma segura *in vivo* sin provocar una respuesta inmunitaria sustancial al anticuerpo tras la administración, a diferencia de los anticuerpos de origen no humano o con anticuerpos humanizados o quiméricos. El método comprende las etapas de administrar un anticuerpo anti-ErbB2 detectablemente marcado o una composición que lo comprende a un sujeto en necesidad de una prueba de diagnóstico tal y someter el sujeto a análisis de imágenes para determinar la localización de los tejidos que expresan ErbB2. El análisis de imágenes es muy conocido en la técnica médica e incluye, sin limitación, análisis de rayos X, imagen por resonancia magnética (IRM) o tomografía computerizada (TC). El anticuerpo puede marcarse con cualquier agente adecuado para la obtención de imágenes *in vivo*, por ejemplo un agente de contraste, tal como bario, que puede usarse para el análisis de rayos X, o un agente de contraste magnético, tal como quelato de gadolinio, que puede usarse para IRM o TC. Otros agentes de marcado incluyen, sin limitación, radioisótopos, tales como ⁹⁹Tc. El anticuerpo anti-ErbB2 puede ser no marcado y se pueden obtener imágenes administrando un segundo anticuerpo u otra molécula que es detectable y que puede unirse al anticuerpo anti-ErbB2. Puede obtenerse una biopsia del sujeto para determinar si el tejido de interés expresa ErbB2.

55 El anticuerpo anti-ErbB2 detectablemente marcado puede comprender un fluoróforo. El fluoróforo puede seleccionarse de un colorante fluorescente de infrarrojos cercano, dinitrofenilo, fluoresceína y derivados de los mismos, rodamina, derivados de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina, Texas red, Rhodamine green, Oregon green, Cascade blue, ficoeritrina, CY3, CY5, CY2, CY7, cumarina, infrared 40, MR 200, IRD 40, Alexa Fluor, Cascade Blue, tetrametilrodamina, Pacific Blue, SYBR y BODIPY. En otra realización, el fluoróforo incluye uno de los siguientes compuestos con sus máximos de emisión indicados en nm entre paréntesis Cy2™ (506), GFP (Red Shifted) (507), YO-PRO®-1 (509), YOYO®-1 (509), Calcein (517), FITC (518), FluorX® (519), Alexa® (520), Rhodamine 110 (520), 5-FAM (522), Oregon Green® 500 (522), Oregon Green® 488 (524), RiboGreen® (525), Rhodamine Green® (527), Rhodamine 123 (529), Magnesium Green® (531), Calcium Green® (533), TO-PRO®-1 (533), TOTO®-1 (533), JOE (548), BODIPY® 530/550 (550), Dil (565), BODIPY® (568), BODIPY® 558/568 (568), BODIPY® 564/570 (570), Cy3® (570), Alexa® 546 (570), TRITC (572), Magnesium

Orange® (575), Phycoerythrin R&B (575), Rhodamine Phalloidin (575), Calcium Orange® (576), Pyronin Y (580), Rhodamine B (580), TAMRA (582), Rhodamine Red® (590), Cy3.5® (596), ROX (608), Calcium Crimson™ (615), Alexa® 594 (615), Texas Red® (615), Nile Red (628), YO-PRO®-3 (631), YOYO®-3 (631), R-ficocianina (642), C-ficocianina (648), TO-PRO®-3 (660), TOTO®-3 (660), DiD DiIc(5) (665), Cy5™ (670), tiadcarbocianina (671) y Cy5.5 (694).

Métodos terapéuticos de uso

En el presente documento se describe un método de inhibición de la actividad de ErbB2 administrando un agente de unión dirigido y/o un anticuerpo anti-ErbB2 a un sujeto en necesidad del mismo. El anticuerpo anti-ErbB2 puede ser un anticuerpo humano, quimérico o humanizado. Preferentemente, la ErbB2 es humana y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa una ErbB2 con la que el agente de unión dirigido y/o anticuerpo anti-ErbB2 reacciona de forma cruzada. El agente de unión dirigido y/o el anticuerpo pueden administrarse a un mamífero no humano que expresa ErbB2 con el que el anticuerpo reacciona de forma cruzada (es decir, un mono cinomolgo) para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos descritos en el presente documento.

En el presente documento se describen métodos de tratamiento o prevención de un trastorno mediado por ErbB2 en un sujeto administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de unión dirigido y/o un anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "un trastorno mediado por ErbB2" pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los que la presencia de niveles altos o elevados de expresión o actividad de ErbB2 en un sujeto que padece el trastorno se ha mostrado que es, o que se sospecha que es, tanto responsable de la fisiopatología del trastorno como un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Tales trastornos pueden ser probados, por ejemplo, por un aumento en la expresión o los niveles de ErbB2 sobre la superficie celular en las células o tejidos afectados de un sujeto que padece el trastorno, o por un aumento en un actividad mediada por ErbB2 en un tipo de célula, tal como en una célula cancerosa, que contribuye a la patología del trastorno o que contribuye al empeoramiento del trastorno. El aumento en los niveles de ErbB2 puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-ErbB2. Un aumento en la actividad de ErbB2 puede detectarse por la elevada fosforilación de ErbB2, activación de la vía MAPK, activación de la vía p38-TSP-1, activación de la vía PI3K, inhibición de CDC2, y combinaciones de los mismos.

En el presente documento se describe un método de inhibición de la proliferación de una célula cancerosa, que expresa ErbB2, en un sujeto en necesidad del mismo, el método puede comprender la etapa de administrar a dicho sujeto un agente de unión dirigido y/o un anticuerpo anti-ErbB2 o porción de unión al antígeno del mismo, en el que dicho agente de unión dirigido o anticuerpo o porción inhibe ErbB2. Otro aspecto proporciona un método de inhibición de una actividad de ErbB2 en una célula que expresa ErbB2, que comprende poner en contacto la célula con un agente de unión dirigido, un anticuerpo anti-ErbB2 o porción de unión al antígeno del mismo, en el que la actividad de ErbB2 en la célula está seleccionada del grupo que consiste en (a) fosforilación de ErbB2; (b) activación de la vía MAPK; (c) activación de la vía p38-TSP-1; (d) activación de la vía PI3K; (e) inhibición de CDC2; y (f) combinaciones de los mismos. La célula puede estar en un sujeto.

El agente de unión dirigido y/o el anticuerpo puede administrarse una vez, pero más preferentemente se administra múltiples veces. El agente de unión dirigido y/o el anticuerpo pueden administrarse de tres veces al día a una vez cada seis meses o más. La administración puede ser en un programa tal como tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez semanalmente, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo también pueden administrarse continuamente mediante una minibomba. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo pueden administrarse mediante una vía oral, mucosa, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraocular, intraespinal, parenteral, intramucosa o tópica. El agente de unión dirigido y/o anticuerpo pueden administrarse por vía local o sistémica.

Las composiciones terapéuticas que comprenden un agente de unión dirigido y/o un anticuerpo anti-ErbB2 pueden administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral, nasal, vaginal, bucal, rectal, mediante el ojo, o mediante la vía pulmonar, en una variedad de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, que serán familiares para aquellos expertos en la materia.

Por ejemplo, los anticuerpos anti-ErbB2 pueden administrarse mediante la vía nasal usando un dispositivo insuflador nasal. Ejemplo de éstas ya se emplean para sistemas en polvo comerciales previstos para administración nasal (por ejemplo, Fisons Lomudal System). Detalles de otros dispositivos pueden encontrarse en la bibliografía farmacéutica (véase, por ejemplo, Bell, A. Intranasal Delivery devices, en Drug Delivery Devices Fundamentals and Applications, Tyle P. (ed), Dekker, New York, 1988).

Los anticuerpos anti-ErbB2 pueden administrarse a la vagina en una formulación en polvo liofilizado. Los anticuerpos anti-ErbB2 pueden administrarse en un aplicador vaginal y una vez en la vagina, comprendiendo la formulación los anticuerpos anti-ErbB2 que son liberados presionando un pistón tipo jeringa o mecanismo de liberación similar en el

aplicador. Alternativamente, los anticuerpos anti-ErbB2 pueden formularse como un polvo usando un dispositivo de polvo, formulado en un supositorio vaginal o pesario o comprimido vaginal o gel vaginal.

5 Los anticuerpos anti-ErbB2 también pueden administrarse al ojo en un formulación en gel. Por ejemplo, antes de la administración, una formulación que contiene los anticuerpos anti-ErbB2 puede estar convenientemente contenida en un recipiente de dosis unitaria de dos compartimentos, un compartimento que contiene una preparación de anticuerpo anti-ErbB2 liofilizada y el otro compartimento que contiene solución salina normal. Antes de la administración, los dos compartimentos se mezclan y se forma un gel, que entonces se administra al ojo.

10 Otras vías de administración para los anticuerpos anti-ErbB2 incluyen mediante la vía pulmonar usando un inhalador de polvo o inhalador de dosis medida, mediante la vía bucal formulados en un comprimido o un parche bucal, mediante la vía rectal formulados en supositorios; y mediante la vía oral en forma de un comprimido, una cápsula o una pella (composiciones que pueden administrar el agente a través del estómago, el intestino delgado o el colon), todos los cuales pueden formularse según técnicas que son muy conocidas para aquellos expertos en la materia.

15 El anticuerpo generalmente se administrará como parte de una composición farmacéutica como se describe arriba. La dosificación de anticuerpo generalmente estará en el intervalo de 0,1-100 mg/kg, más preferentemente 0,5-50 mg/kg, más preferentemente 1-20 mg/kg, e incluso más preferentemente 1-10 mg/kg. La concentración en suero del anticuerpo puede medirse por cualquier método conocido en la técnica.

20 La co-administración del anticuerpo con un agente terapéutico adicional (terapia de combinación) engloba administrar una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-ErbB2 y el agente terapéutico adicional, además de administrar dos o más composiciones farmacéuticas separadas, una que comprende el anticuerpo anti-ErbB2 y la(s) otra(s) que comprende(n) el (los) agente(s) terapéutico(s) adicional(es). Además, aunque la co-administración o terapia de combinación generalmente significa que el anticuerpo y agentes terapéuticos adicionales se administran al mismo tiempo el uno que el otro, también engloba casos en los que el anticuerpo y los agentes terapéuticos adicionales se administran en momentos diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse una vez cada tres días, mientras que el agente terapéutico adicional se administra una vez al día. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse antes o después del tratamiento del trastorno con el agente terapéutico adicional, por ejemplo después de que un sujeto haya fracasado en la terapia con el agente adicional. Similarmente, la administración del anticuerpo anti-ErbB2 puede administrarse antes o después de otra terapia, tal como inmunoterapia.

35 El anticuerpo y uno o más agentes terapéuticos adicionales (la terapia de combinación) pueden administrarse una vez, dos veces, o al menos el periodo de tiempo hasta que la afección se trata, palia o cura. Preferentemente, la terapia de combinación se administra múltiples veces. La terapia de combinación puede administrarse de tres veces al día a una vez cada seis meses. La administración puede ser en un programa tal como tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses, o puede administrarse continuamente mediante una minibomba. La terapia de combinación puede administrarse mediante una vía oral, mucosa, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intraocular, intraespinal, intraperitoneal, intramuscular, parenteral, intratumoral o tópica.

45 El anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento puede marcarse con una radiomarca, una inmunotoxina o una toxina, o es una proteína de fusión que comprende un péptido tóxico. El anticuerpo anti-ErbB2 o la proteína de fusión de anticuerpo anti-ErbB2 dirige la radiomarca, inmunotoxina, toxina o péptido tóxico a la célula que expresa ErbB2. La radiomarca, inmunotoxina, toxina o péptido tóxico puede ser internalizada después de que el anticuerpo anti-ErbB2 se una a la ErbB2 sobre la superficie de la célula.

50 Terapia génica

Las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento pueden administrarse a un sujeto en necesidad de las mismas mediante terapia génica. La terapia puede ser tanto *in vivo* como *ex vivo*. Pueden administrarse a un sujeto moléculas de ácidos nucleicos que codifican tanto una cadena pesada como una cadena ligera. Las moléculas de ácidos nucleicos pueden administrarse de forma que sean establemente integradas en los cromosomas de linfocitos B debido a que estas células están especializadas en producir anticuerpos. Pueden transfectarse o infectarse linfocitos B precursores *ex vivo* y re-trasplantarse en un sujeto en necesidad del mismo. Pueden infectarse linfocitos B precursores u otras células *in vivo* usando un virus que se sabe que infecta el tipo de célula de interés. Vectores típicos usados para terapia génica incluyen liposomas, plásmidos y vectores virales. Vectores virales a modo de ejemplo son retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados. Después de la infección tanto *in vivo* como *ex vivo*, pueden monitorizarse niveles de expresión de anticuerpo tomando una muestra del sujeto tratado y usando cualquier inmunoensayo conocido en la técnica o tratado en el presente documento.

65 El método de terapia génica puede comprender las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción de unión al antígeno de la misma de un anticuerpo anti-ErbB2 y que expresa la molécula de ácido nucleico. El método de terapia génica puede comprender las etapas de administrar

una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena ligera o una porción de unión al antígeno de la misma de un anticuerpo anti-ErbB2 y que expresa la molécula de ácido nucleico. En un método más preferente, el método de terapia génica comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción de unión al antígeno de la misma y una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena ligera o la porción de unión al antígeno de la misma de un anticuerpo anti-ErbB2 descrito en el presente documento y que expresa las moléculas de ácidos nucleicos. El método de terapia génica también puede comprender la etapa de administrar otro agente terapéutico, tal como un agente antineoplásico.

Con el fin de que la presente invención pueda entenderse mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son para fines de ilustración solo y no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLO 1

INMUNIZACIÓN Y VALORACIÓN

Inmunización

Se obtuvo la proteína de fusión recombinante ECD de ErbB2 humana/Fcγ1 que contiene el dominio extracelular de ErbB2 humana y la región Fc de IgG1 humana de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, catálogo de MN N.º1129-ER/CF) para su uso como inmunogén. Se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra ErbB2 inmunizando secuencialmente ratones Xenomouse® (cepa XM3B-3 de Xenomouse, Abgenix, Inc. Fremont, CA) mediante inyección por vía en la almohadilla plantar. La primera inyección fue con 10 µg de ECD de ErbB2 humana/Fcγ1 recombinante en Titermax Gold (Sigma, catálogo N.º T2684, lote N.º K1599) por ratón. Los siguientes 10 refuerzos fueron con 10 µg de ECD de ErbB2 humana/Fcγ1 recombinante en 15 µl de qCpG (ImmunEasy Mouse Adjuvant, catálogo N.º 303101; Qiagen), mezclado con 5 µl de Adju-Phos (gel de fosfato de aluminio, catálogo N.º 1452-250, HCl Biosector) por ratón. El volumen total de cada inyección fue 50 µl por ratón, 25 µl por almohadilla plantar. Los ratones se inmunizaron dos veces a la semana durante 5 semanas y la fusión se realizó en el día 39.

Selección de animales para recogida por título

Los ratones Xenomouse inmunizados se sangraron después del 8º refuerzo, y se determinaron los títulos de anticuerpos anti-ErbB2 en los sueros por análisis FACS (citometría de flujo activada por fluorescencia).

Para este fin, se construyó un vector de expresión de ErbB2 humana y se transfectaron células pre-B B300.19 de ratón para expresar la proteína ErbB2 humana. Se derivó ADNc de ErbB2 humana por RT-PCR de células A431 de carcinoma epidermoide humano (ATCC, catálogo N.º CRL-1555) y se clonaron en el vector de expresión pCR3.1 (Invitrogen, catálogo N.º K3000) mediante sitios de escisión por restricción con endonucleasa HindIII y NotI. El vector de expresión contuvo un inserto de 3768 pb que codificaba la ErbB2 humana de longitud completa. El plásmido anterior se transfectó en células B300.19 usando el método de electroporación. Se seleccionaron clones B300.19 estables que expresaban la proteína hErbB2 en presencia de puomicina (2,5 µg/ml) y entonces se cribaron por FACS con un anticuerpo anti-hErbB2 quimérico (denominado en el presente documento 2C4, producido como se detalla en Cancer Immunol. Immunotherapy (2006) 55:717-727 titulado "Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab") seguido de anti-IgG de ratón de cabra-PE (Caltag, catálogo N.º M30004-4). Se seleccionó el clon B300.19/hErbB2 N.º 44, que da la mayor media geométrica en FACS, para la determinación de títulos en suero.

Se valoraron sueros de ratones inmunizados y sangrados en tampón FACS (PBS con 2 % de FBS) a diluciones 1:50, 1:250 o 1:1250. Se incubaron células del clon B300.19/hErbB2 N.º 44 (células positivas) y células parentales B300.19 (células negativas) con sueros sucesivamente diluidos durante 1 hora, y luego con anti-IgG humana de cabra conjugada con Cy5 (Jackson ImmunoResearch Labs/JIR, catálogo N.º 109-176-098) durante otros 30 minutos. Se usó el mAb anti-ErbB2 2C4 como control positivo mientras que un anticuerpo anti-KLH G1 generado en casa (Gmix) se usó como control de isotipo de G1. Después de un amplio lavado, las células se resuspendieron en tampón FACS y se analizaron en un instrumento BD FACS. Se determinó la media geométrica de cada muestra después del análisis de datos y se muestra en la Tabla 2 a continuación. La relación de la media geométrica en células positivas para ErbB2 con respecto a la media geométrica en células negativas para ErbB2 se correlaciona con la capacidad de unión específica a ErbB2. Los controles negativos, que incluyen control de isotipo G1 anti-KLH Gmix, anticuerpos secundarios de control anti-IgG de ratón de cabra-Cy5 (JIR, catálogo N.º 115-176-071) y anti-IgG humana de cabra-PE solos, dio una relación de media geométrica de por debajo de 1. Aunque el mAb de control positivo 2C4 y los sueros de los 10 ratones inmunizados dieron relaciones entre 2,98 y 7,55, por tanto todos los ratones desarrollaron respuesta inmunitaria humoral a ErbB2 humana.

Tabla 2. Títulos del suero: 10 ratones (cepa XM3B-3)

Muestras ID de ratón	Medias geométricas			
	Dilución del ensayo	Media geométrica de células pos	Media geométrica de células neg	Relación de medias geométricas
5152-1	1:50	324	62,2	5,21
	1:250	251	45,1	5,57
	1:1250	177	26,5	6,68
5152-2	1:50	308	75	4,11
	1:250	209	39,9	5,24
	1:1250	146	23,4	6,24
5152-3	1:50	304	85,3	3,56
	1:250	199	40,1	4,96
	1:1250	157	21,1	7,44
5152-4	1:50	331	111	2,98
	1:250	227	42,8	5,30
	1:1250	166	22	7,55
5152-5	1:50	196	55,1	3,56
	1:250	142	26,4	5,38
	1:1250	91,7	16,2	5,66
5152-6	1:50	214	66,9	3,20
	1:250	129	33,1	3,90
	1:1250	92,4	17,5	5,28
5152-7	1:50	278	88,1	3,16
	1:250	157	38,1	4,12
	1:1250	122	20,5	5,95
5152-8	1:50	240	58,3	4,12
	1:250	168	27,2	6,18
	1:1250	94,3	16	5,89
5152-9	1:50	208	46,2	4,50
	1:250	137	24,1	5,68
	1:1250	89,9	15,9	5,65
5152-10	1:50	256	82,9	3,09
	1:250	157	40,5	3,88
	1:1250	131	22,7	5,77

EJEMPLO 25 RECUPERACIÓN DE LINFOCITOS, AISLAMIENTO DE LINFOCITOS B, FUSIONES Y GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS

Se recogieron ganglios linfáticos (LN) de los ratones inmunizados y se procesaron en 3 ml de tampón FASC estéril (PBS, 2 % de FBS). Las células LN se filtraron a través de un filtro de células de 40 µm, se centrifugaron a 400 g durante 3 minutos y se resuspendieron en 3 ml de tampón FACS fresco. Las células se contaron, y entonces se añadieron anticuerpos biotinilados contra CD90 (Pharmingen, catálogo N.º 553002), CD4 (Pharmingen, catálogo N.º 553728), CD8 (Pharmingen, catálogo N.º 553029) e IgM (Pharmingen, catálogo N.º 555781). Las células y los anticuerpos anteriores se mezclaron suavemente y se incubaron durante 10 minutos sobre hielo. Las células se centrifugaron nuevamente y se lavaron una vez con tampón FACS. Se añadieron perlas SA Dynal (M-280) a las células a una relación de 4:1 de perlas con respecto a células diana, y se incubaron a temperatura ambiente durante 12 minutos con rotación. Las células/perlas en tubos de 15 ml se dispusieron en el campo magnético del imán Dynal durante 2 minutos. El sobrenadante que contenía la fracción de IgM- se transfirió a un tubo nuevo y la etapa de imán se repitió una vez más. El sobrenadante de células se transfirió a un tubo final y se contaron las células IgM- y se separaron en alícuotas para la fusión.

La fusión se realizó mezclando los linfocitos B enriquecidos lavados de antes y células P3X63Ag8.653 de mieloma no secretor compradas de ATCC (catálogo N.º CRL 1580) (Kearney et al, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550) a una relación de 1:1. La mezcla de células se sedimentó suavemente por centrifugación a 800 x g. Después de la eliminación completa del sobrenadante, las células se trataron con 2-4 ml de solución de Pronase (CalBiochem, cat. N.º 53702; 0,5 mg/ml en PBS) durante no más de 2 minutos. Entonces se añadieron 3-5 ml de FBS para detener la actividad enzimática y la suspensión se ajustó a 40 ml de volumen total usando la solución de fusión electrónica de células (ECFS: sacarosa 0,3 M, acetato de magnesio 0,1 mM, acetato de calcio 0,1 mM, todos de Sigma). El sobrenadante se eliminó después de la centrifugación y las células se resuspendieron en 40 ml de ECFS. Se repitió esta etapa de lavado y las células se resuspendieron nuevamente en ECFS a una concentración de 2×10^6 células/ml.

Se realizó la fusión electrónica de células usando un generador de fusión (modelo ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego, CA), según la configuración estándar del instrumento. Después de ECF, las suspensiones de células se sacaron cuidadosamente de la cámara de fusión y se transfirieron a un tubo estéril que contenía el mismo volumen de medio de cultivo de hibridomas que contenía DMEM (JRH Biosciences), 15 % de FBS (Hyclone), complementado con L-glutamina, penicilina/estreptomicina, OPI (oxaloacetato, piruvato, insulina bovina) (todos de Sigma) e IL-6 (Boehringer Mannheim). Las células se incubaron durante 15-30 minutos a 37 °C, y a continuación se centrifugaron a 400 x g (1000 rpm) durante cinco minutos. Las células se resuspendieron suavemente en medio de selección de hibridomas (medio de cultivo de hibridomas complementado con 0,5x HA (Sigma, cat. N.º A9666)), basado en una siembra final de 2×10^5 linfocitos B totales por placa de 96 pocillos y 200 μ l por pocillo. Las células se mezclaron suavemente y se pipetearon en placas de 96 pocillos y se dejó que crecieran. En el día 7 o 10, la mitad del medio se eliminó, y las células volvieron a alimentarse con medio de selección de hibridomas.

EJEMPLO 3

15 CRIBADO DE ANTICUERPOS POR FMAT/FACS

Después de 14 días de cultivo, se cribaron sobrenadantes de hibridoma para anticuerpos específicos de ErbB2 por FMAT (tecnología de ensayo de microvolumen fluorométrico). Brevemente, se mezclaron 4275 células de B300.19/hErbB2 (células positivas) o B300.19 (células negativas para ErbB2) con 400 ng/ml de Cy5-anti-IgG humana de cabra (JIR, catálogo N.º 109-176-098) en 15 μ l de tampón FACS y entonces se incubaron con 15 μ l de sobrenadantes de hibridoma durante 3 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo de control positivo fue anti-hErbB2 (2C4), que se detectó con Cy5-anti-IgG gamma de ratón de cabra (JIR, catálogo N.º 115-176-071) o anti-IgG de ratón de cabra-Biot (catálogo de Southern Biotechnology/SB N.º 1030-08, 400 ng/ml) en combinación con SA-Cy5 (catálogo de JIR N.º 016-170-084, 350 ng/ml). Se usó un anticuerpo anti-KLH G1 (Gmix, en casa) como control de isotipo. Las placas se leyeron en sistemas FMA 8100 HTS de Applied Biosystems. Se determinaron tanto las señales de fluorescencia como los recuentos después del análisis de datos y se identificaron 362 hibridomas positivos que mostraron unión a células positivas para ErbB2, pero no a células negativas.

Los 362 sobrenadantes positivos en el cribado de FMAT se cribaron adicionalmente por FACS en dos conjuntos, uno para la detección de la cadena pesada de hIgG y el otro para la detección de la cadena ligera kappa de Ig humana, para demostrar composición completamente humana para tanto las cadenas gamma de Ig como kappa de Ig. Se incubaron $2,5 \times 10^5$ células B300.19/hErbB2 o células parentales B300.19 con sobrenadantes de hibridoma diluidos a 1:2 en tampón FACS durante 1 hora a 4 °C y luego se lavaron con PBS. Entonces, las células se incubaron con anti-gamma humana de cabra-Cy5 durante 1 hora a 4 °C para la detección de Ig gamma, o con anti-kappa humana de cabra-PE (SB catálogo N.º 2063-09) durante 1 hora a 4 °C para la detección de Ig kappa. Después de lavar, las células se fijaron en 1 % de paraformaldehído/PBS antes del análisis de FACS. Se usaron sueros reunidos a 1:50 de dilución como control positivo mientras que se usó 1:10 de Gmix diluido (anti-KLH IgG) como control de isotipo negativo en el ensayo. Se tabuló la relación de los valores de la media geométrica entre células positivas y negativas y los hibridomas que dieron relaciones superiores a 1,95 se consideraron éxitos. Se confirmaron en este cribado un total de 152 anticuerpos anti-hErbB2 IgG/kappa completamente humanos.

EJEMPLO 4

45 INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE ERBB2 INDUCIDA POR HEREGULINA- β EN CÉLULAS MCF7

La ErbB2 se fosforila con tirosina tras la activación mediante dimerización con otros miembros de la familia de ErbB, tales como ErbB3. La heregulina- β que se une a ErbB3 puede inducir la fosforilación por tirosina de ErbB2 en células MCF7 de adenocarcinoma de mama humano, que expresan tanto ErbB2 como ErbB3. Para identificar anticuerpos que bloquean la activación de ErbB2, los presentes inventores cribaron 152 anticuerpos que se unían a ErbB2 humana en ensayos de fosforilación de ErbB2 basada en células.

Se sembraron células MCF7 a 25.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se cultivaron en medio de crecimiento completo (10 % de FCS) durante la noche. Al día siguiente, las placas de cultivo celular se lavaron una vez con PBS y el medio de cultivo se sustituyó con medio libre de rojo de fenol y libre de suero. Las células se privaron de suero durante la noche, y luego se cultivaron con 25 μ l de sobrenadantes de hibridoma mezclados con 25 μ l de medio libre de rojo de fenol durante 1 hora antes de tratarse con heregulina- β 10 nM durante 10 minutos. Alternativamente, las células no se privaron de suero, pero se incubaron con sobrenadantes de hibridoma durante la noche (~24 h) antes del tratamiento con heregulina- β .

Para preparar lisados celulares, las células se lavaron en PBS frío en hielo dos veces y se incubaron con 100 μ l/pocillo de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM a pH 7,7, 1 % de Triton X-100, 10 % de glicerol, NaCl 100 mM, EDTA 2,5 mM, NaF 10 mM, 40 μ g/ml de PMSF, pepstatina 1 μ M, 0,5 μ g/ml de leupeptina, 10 μ g/ml de inhibidor de tripsina de soja, NaVO₄ 0,2 mM, NaMoO₄ 1 mM, b-glicerofosfato 5 mM) a 4 °C durante 30 minutos. Se midió el nivel de fósforo-ErbB2 usando un kit de ELISA de fósforo-ErbB2 humana de R&D Systems (human Phospho-ErbB2 DuoSet IC, Catálogo N.º DYC1768), según el protocolo proporcionado. El porcentaje de inhibición se calculó basándose en el nivel de pErbB2 en células no estimuladas y células estimuladas con heregulina en ausencia de anticuerpos.

La Figura 1 ilustra la correlación de las actividades neutralizantes de los 152 anticuerpos probados cuando se pre-incubaron con células MCF7 durante 1 h frente a 24 h durante la noche. 51 de los 152 anticuerpos dieron más del 30 % de inhibición cuando las células se pre-incubaron con sobrenadantes durante 1 hora. Estos anticuerpos probablemente inhiben la fosforilación de ErbB2 bloqueando la dimerización de ErbB2 con ErbB3. Significativamente más anticuerpos demostraron más del 30 % de inhibición cuando las células se pre-incubaron con sobrenadantes de hibridoma durante la noche. Algunos de estos pueden hacerlo por otro mecanismo tal como induciendo la regulación por disminución de ErbB2.

EJEMPLO 5

DETERMINACIÓN DE LA REACTIVIDAD CRUZADA CON ERBB2 DE CINO

Para determinar la reactividad cruzada de especies de estos anticuerpos para sensibilizar a ErbB2 de cinomolgo de primate no humano, se generaron células CHO-K1 que expresan ErbB2 de cinomolgo. Brevemente, se derivó el ADNc de ErbB2 de cino de tejidos de ovario y se clonó en el vector de expresión pCR3.1 mediante sitios de endonucleasa de restricción HindIII y XbaI. El vector de expresión, cino-ErbB2 (FL)/pCr3.1 que contiene un inserto de 3767 pb, se transfectó en célula CHO-k1 usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, catálogo N.º 11668) según el protocolo proporcionado. Se seleccionaron clones estables de ErbB2 de cino que expresaban CHO-K1 en presencia de G418 a 1 mg/ml. La expresión se confirmó por FACS usando anti-c-ErbB2 humana de ratón/c-neu (Ab-2) (Oncogene, catálogo N.º OP14) y anti-IgG de ratón de cabra-PE (Caltag, catálogo N.º M30004-4).

Se usó el clon CHO-K1/E4rbB2 de cino N.º 4 para medir la reactividad cruzada de los anticuerpos que se unían a ErbB2 humana. Se incubaron 200.000 células del clon CHO-K1/E4rbB2 de cino N.º 4 o CHO-K1 parental con 1:2 de sobrenadantes de hibridoma diluidos o 2 µg/ml de anticuerpo de control positivo Ab-2 (Oncogene, catálogo N.º OP14) durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron una vez con PBS, y luego se incubaron con anticuerpo de detección secundario a 5 µg/ml de anti-IgG humana de cabra-Cy5 o anti-IgG de ratón de cabra-Cy5 durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con PBS, se fijaron en 1 % de paraformaldehído/PBS y luego se analizaron por FACS. Para cada tinción, se tabuló la relación de valores de la media geométrica entre células positivas y negativas y una relación superior a 1,95 se consideró positiva. Se encontró que ocho anticuerpos no reaccionaban de forma cruzada con ErbB2 de cino y se excluyeron de análisis posteriores.

EJEMPLO 6

ELISAS DE ANTÍGENO ALTO Y DE ANTÍGENO LIMITADO

Se caracterizaron adicionalmente 113 anticuerpos anti-ErbB2 que demostraron reactividad cruzada con ErbB2 de cino, y también mostraron ≥30 % de inhibición de la fosforilación de ErbB2 cuando se incubaron con células durante tanto 1 h como durante la noche, por ELISAs de antígeno alto (HA) y de antígeno limitado (LA).

Se realiza ELISA de HA con altas concentraciones de antígeno recubierto sobre placa, y es una reacción dependiente de la concentración; mientras que se realiza ELISA de LA con cantidad limitada de antígeno recubierto sobre placa y así es una reacción dependiente de afinidad. La clasificación de la afinidad relativa de los anticuerpos puede lograrse a partir de análisis de HA/LA.

Como la proteína de fusión recombinante ECD de ErbB2 humana-Fcy1 no puede usarse para este fin, se generó una proteína de fusión ECD de ErbB2 humana-myc/His en casa. El ADNc de ErbB2 humana/ECD se derivó de células A431 y se clonó en el vector de expresión pSecTag2Hygro (Invitrogen, catálogo N.º V910-20) mediante los sitios de escisión por endonucleasa de restricción NheI y XhoI. El vector de expresión, huErbB2 (ECD)/pSecTag2BHygro, contuvo un tamaño de inserto de 1956 pb para ErbB2 (ECD) solo y 2034 pb para hErbB2 (ECD) más la marca c-myc/His. El plásmido se transfectó transitoriamente en células en suspensión 293T usando 293fectin (catálogo de Invitrogen N.º 12347-019). Las células se trataron con butirato de sodio un día después de la transfección para reforzar los niveles de expresión. 4 días después de la transfección, el sobrenadante se probó para la expresión de ErbB2 (ECD) antes de la purificación. Para la detección por ELISA, se usó 1 µg/ml de anti-ErbB2 de cabra (R&D Systems, catálogo N.º AF1129) para recubrir las placas, 1 µg/ml de anti-ErbB2 de ratón (R&D Systems, catálogo N.º MAB 1129) fue el anticuerpo de detección primario y el anticuerpo secundario fue anti-IgG de ratón de cabra-HRP (Caltag, catálogo N.º M30107). El sobrenadante se recogió y se concentró 5 veces y luego se dializó en tampón de diálisis (NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8, NaCl 200 mM) durante la noche. Se añadió imidazol al sobrenadante a una concentración final de 5 mM y el sobrenadante se incubó con 1/100 volumen de mezcla de resinas Ni-NTA Superflow (Qiagen, Cat N.º 30430) durante 3 horas a TA. La resina se lavó con un tampón que contenía NaHPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM, y luego con el tampón de elución que contenía imidazol 250 mM, NaHPO₄ 50 mM y NaCl 300 mM. La proteína purificada se dializó finalmente en PBS para preservar la actividad. La proteína purificada huErbB2 (ECD)/c-myc/His tiene 655 AA, con un MW teórico de 72,2 kDa, eluye a aproximadamente 100 kDa en un gel al 4-20 % de Tris-Glicina SDS-PAGE. La identidad de proteína se confirmó por transferencia Western usando un anti-ErbB2 monoclonal de ratón (R&D Systems, Cat N.º MAB1129) seguido de un anti-IgG de ratón de cabra-HRP secundario (Caltag, cat N.º M30107).

Para HA, se recubrieron 10 µg/ml de ECD de ErbB2 humana-myc/His en PBS a placas de ELISA durante la noche a 4 °C. Para LA, se recubrieron 100, 500, 250, 125, 62 y 31 ng/ml de ECD de ErbB2 humana-myc/His. Las placas recubiertas con antígeno se lavaron tres veces, se bloquearon con 1 % de leche desnatada sin grasa/PBS durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se lavaron otra vez tres veces. Cada muestra de línea de hibridoma se valoró en 1 % de leche desnatada sin grasa/PBS 1:3 para 7 puntos a partir de una dilución 1:25. Se transfirieron muestras de hibridoma diluidas sucesivamente o controles (Herceptin®) a placas recubiertas de HA y se transfirieron muestras de hibridoma diluidas 1:25 a placas recubiertas de LA. Las muestras se incubaron sobre placas a temperatura ambiente durante la noche durante 18,5 horas. Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces y se incubaron con 50 µl de 400 ng/ml de anti-IgG humana de cabra inmunopuro (Fc)-HRP (catálogo de Pierce N.º 31416) durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces, las placas se lavaron ampliamente y se secaron de forma oportuna sobre una toalla de papel para eliminar HRP residual en pocillos. Se añadió sustrato de HRP TMB (TMB Enhanced K-blue, catálogo de Neogen N.º 308177) a cada pocillo y se incubó durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N. Se leyó la densidad óptica a 450 nm en un lector de microplacas (Titertek Multiskan Ascent).

La concentración de anticuerpos específicos de ErbB2 en sobrenadantes de hibridoma se derivó de una curva patrón generada con concentraciones conocidas de Herceptin® en ELISA de HA. Se representó la señal de DO de LA a 31 ng/ml de antígeno contra la concentración de anticuerpo de HA para cada muestra de hibridoma, como se muestra en la Figura 2. Los anticuerpos en la esquina izquierda superior tienen afinidades relativamente altas en comparación con los anticuerpos en la esquina derecha inferior en este gráfico.

EJEMPLO 7

CLONACIÓN DE HIBRIDOMAS

Basándose en los datos de la prueba de reactividad cruzada de cino, la inhibición de los ensayos de fosforilación de ErbB2 y ELISAs de LA/HA, se seleccionaron 31 líneas de hibridoma para la clonación. Sus actividades se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos de caracterización preliminar de líneas de hibridoma seleccionadas para clonación

ID DE LÍNEA	% de inhibición de pTyr en 1 h	% de inhibición de pTyr en 24 h	Reactividad cruzada de cino	HA promedio (ug/ml)	LA a 31 ng/ml
1*14	103	100	Sí	7,27	3,99
1*15	86	100	Sí	0,61	2,31
1*18	85	96	Sí	1,22	3,03
1*20	91	96	Sí	1,5	2,84
1*22	84	95	Sí	1,06	1,61
1*37	96	96	Sí	1,3	3,33
1*39	82	99	Sí	0,68	2,57
1*62	82	98	Sí	0,51	2,8
1*96	97	99	Sí	6,48	4,6
1*99	97	99	Sí	6,18	4,05
1*100	95	95	Sí	2,85	3,54
1*108	90	100	Sí	4,41	2,64
1*124	94	97	Sí	2,86	3,42
1*128	96	98	Sí	5,86	3,83
1*140	97	97	Sí	4,39	3,54
1*148	96	97	Sí	3,29	3,35
1*149	83	89	Sí	0,43	1,54
1*19	73	97	Sí	0,4	1,77
1*24	77	99	Sí	1,77	2,35
1*33	73	101	Sí	0,9	2,07
1*41	26	86	Sí	1,3	3,2
1*43	43	82	Sí	1,3	3,57
1*44	78	98	Sí	3,64	2,38
1*69	57	72	Sí	0,34	1,6
1*71	27	65	Sí	3,1	2,62
1*74	66	90	Sí	0,20	1,22
1*79	71	93	Sí	0,26	1,77
1*95	58	95	Sí	0,23	1,14
1*104	21	73	Sí	1,7	2,36
1*107	57	82	Sí	0,25	1,15
1*111	78	98	Sí	0,77	1,97

Se clasificaron células en cada línea de hibridoma en FACS Aria (BD) en placas de 96 pocillos a 1 célula/pocillo y se cultivaron durante aproximadamente 2 semanas. Se cribaron sobrenadantes de clones individuales para actividad de unión de ErbB2 por FMAT en células BT474 que expresan nivel alto de ErbB2, y también para la composición de cadena gamma y kappa de Ig humana, además de la presencia de IgM humana e IgM de ratón por ELISA.

Para FMAT, se incubaron 6000 células BT474 (ATCC) en 40 µl de tampón FACS en placas FMAT de 384 pocillos con 15 µl de sobrenadantes durante 2 horas a temperatura ambiente y luego con 10 µl de 4,5 µg/ml de anti-IgG humana de cabra-Cy5 durante 6 horas a temperatura ambiente antes de leer en la máquina de FMAT 8200. Se analizaron tanto datos de fluorescencia como de recuentos. Se usó Herceptin® como control positivo en el cribado.

Para el análisis de la composición de la cadena del anticuerpo humano, se recubrieron placas de 96 pocillos de unión a medio (Coastar 3368) con 2 µg/ml de anti-IgG humana de cabra-Fc en PBS durante la noche a 4 °C, y se bloquearon con 1 % de leche/PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se diluyeron 1:5 en 1 % de leche/PBS y se añadieron a dos placas de ELISA recubiertas, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Entonces se añadieron anti-kappa humana de cabra biotinilado (catálogo de Vector N.º BA3060) a 250 ng/ml en 1 % de leche/PBS o anti-lambda humana de cabra biotinilado (catálogo de Southern Biotech N.º 2070-08) a 250 ng/ml en 1 % de leche/PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de incubación con conjugado estreptavidina-peroxidasa a 1 µg/ml en 1 % de leche/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron ampliamente entre etapas de incubación. Se añadieron 50 µl de sustrato de peroxidasa TMB y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, y la reacción enzimática se inactivó con 50 µl de HCl 1 M. La densidad óptica se leyó a 450 nm en un lector de microplacas (Titertek Multiskan Ascent).

Los presentes inventores confirmaron la ausencia de IgM humana del siguiente modo. Se recubrieron placas de 96 pocillos de unión a medio (Coastar 3368) con 1 µg/ml de anti-IgM humana de cabra en PBS durante la noche a 4 °C, y se bloquearon con 1 % de leche/PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se diluyeron 1:5 en 1 % de leche/PBS y se añadieron a las placas de ELISA recubiertas, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Entonces se añadió anti-IgM humana de burro-POD (catálogo de Accurate Chemical N.º JNH035043) a 666 ng/ml en 1 % de leche/PBS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se desarrollaron mediante la adición de sustrato POD como se ha descrito anteriormente.

Los presentes inventores confirmaron la ausencia de IgM humana del siguiente modo. Se recubrieron placas de 96 pocillos de unión a medio con 1 µg/ml de anti-lambda de ratón de cabra (Southern Biotech 1060-01) en PBS durante la noche a 4 °C, y se bloquearon con 1 % de leche/PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se diluyeron 1:5 en 1 % de leche/PBS y se añadieron a las placas de ELISA recubiertas, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Entonces se añadió anti-IgG humana de cabra (Fc)-POD (catálogo de Pierce N.º 31413) a 400 ng/ml en 1 % de leche/PBS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se desarrollaron mediante la adición de sustrato POD como se ha descrito antes.

En los ELISAs descritos anteriormente, se usó la señal de pocillos sin anticuerpos primarios como referencia y se consideraron positivas las muestras que dieron señales que estuvieron 3 veces por encima de la referencia.

Los anticuerpos monoclonales que demostraron unión nativa a ErbB2 por FMAT y que fueron positivos para la cadena gamma y la cadena kappa humanas por ELISAs se derivaron de 20 líneas de hibridoma después de la clonación. Se secuenciaron tres subclones de cada línea parental. A menos que se indique lo contrario, los tres subclones fueron idénticos. Por ejemplo, los subclones 1.14.1, 1.14.2 y 1.14.3 del clon de origen 1.14 tuvieron todos la misma secuencia y se refieren indistintamente por el nombre de origen de dos números o el nombre del subclon de tres números. Se identificaron once anticuerpos monoclonales únicos y se caracterizaron adicionalmente en ensayos funcionales basados en célula.

EJEMPLO 8

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA ERBB2

Se secuenciaron los dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera de los anticuerpos. La información de secuencia completa para los anticuerpos anti-ErbB2 se proporciona en el Listado de secuencias con secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para cada combinación de cadenas gamma y kappa. Las regiones variables (V) de cadenas de inmunoglobulina están codificadas por múltiples segmentos de ADN de la línea germinal, que se unen en regiones variables funcionales (V_HD_{JH} o V_KJ_K) durante la ontogenia de linfocitos B. Se analizaron las secuencias pesadas variables para determinar la familia de V_H, la secuencia de región D y la secuencia de región J. Las secuencias se tradujeron entonces para determinar la secuencia de aminoácidos primaria y se compararon con las secuencias de las regiones V_H, D y J de la línea germinal para evaluar hipermutaciones somáticas. Se analizaron similarmente las secuencias de cadena ligera variable pesada.

La Tabla 4 y la Tabla 4(a) son tablas que comparan las regiones de cadena pesada del anticuerpo con su región de cadena pesada de la línea germinal relacionada. La Tabla 5 es una tabla que compara las regiones de cadena ligera kappa del anticuerpo con su región de cadena ligera de la línea germinal relacionada. La diferencia entre las Tablas

4 y 4(a) es la definición usada para definir las CDR1s de cadena pesada. Las CDR1s de cadena pesada desveladas en la Tabla 4(a) son de la definición de Kabat. Alternativamente, las CDR1s pueden definirse usando una definición alternativa para incluir los cuatro últimos restos de la secuencia de FR1 como se muestra en la Tabla 4.

- 5 El análisis de 20 anticuerpos individuales específicos para ErbB2 indicó que algunos de ellos son idénticos y solo 11 anticuerpos monoclonales únicos que resultaron de la clonación de 8 de los 11 anticuerpos son muy similares en secuencia y se derivaron de los mismos genes VH y VK de la línea germinal.

10 Debe también apreciarse que donde se diferencie un anticuerpo particular de su secuencia respectiva de la línea germinal al nivel de aminoácido, la secuencia de anticuerpos puede retro-mutarse a la secuencia de la línea germinal. Tales mutaciones correctivas pueden producirse en una, dos, tres o más posiciones, o una combinación de cualquiera de las posiciones mutadas, usando técnicas de biología molecular estándar. A modo de un ejemplo no limitante, la Tabla 4 muestra que la secuencia de cadena pesada de 1.24.3 se diferencia de la secuencia de la línea germinal correspondiente en el aminoácido 33 por una T a una S en la región CDR1. Así, la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que codifica la cadena pesada de 1.24.3 puede modificarse para cambiar la T a una S para dar la secuencia de la línea germinal en el sitio de la mutación. En otro ejemplo, la secuencia de cadena pesada de 1.140.1 se diferencia de la secuencia de la línea germinal correspondiente en el aminoácido 42 por una R a una G en la región FR2. Así, la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que codifica la cadena pesada de 1.140.1 puede modificarse para cambiar la R a una G para dar la secuencia de la línea germinal en el sitio de la mutación.

25 A modo de otro ejemplo no limitante, la Tabla 5 muestra que la secuencia de cadena ligera de 1.140.1 se diferencia de la secuencia de la línea germinal correspondiente por una mutación T a N (mutación 1) en la región FR1, por una F a L, F a Y y C a Y (mutaciones 2, 3 y 4) en la región CDR1, por una R a K y N a K en la región FR2 (mutaciones 5 y 6) y por una F a Y, G a S y S a T en la región CDR3. Así, la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que codifica la cadena ligera de 1.140.1 puede modificarse para cambiar la mutación 1 para dar la secuencia de la línea germinal en el sitio de mutación 1. Además, la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que codifica la cadena ligera de 1.140.1 puede modificarse para cambiar la mutación 2 dando la secuencia de la línea germinal en el sitio de mutación 2. Todavía además, la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que codifica la cadena ligera de 1.140.1 puede modificarse para cambiar la mutación 3 dando la secuencia de la línea germinal en el sitio de mutación 3. Todavía adicionalmente otra vez, la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que codifica la cadena ligera de 1.140.1 puede modificarse para cambiar la mutación 1, mutación 2, mutación 3, mutación 4, mutación 5 y mutación 6 para dar la secuencia de la línea germinal en éstas. La Tabla 6 a continuación ilustra la posición de tales variaciones de la línea germinal para 1.140. Cada fila representa una combinación única de restos de línea germinal y no de línea germinal en la posición indicada por la letra en negrita. La Tabla 6 también se aplica al anticuerpo 1.39 ya que el análisis de cadenas ligeras para el anticuerpo 1.39 es idéntico a 1.140 con respecto a las mutaciones de la línea germinal. Además, el análisis de cadenas ligeras para el anticuerpo 1.96 es idéntico a 1.140 con respecto a las mutaciones de la línea germinal, excepto que el anticuerpo 1.96 tiene una diferencia entre la secuencia de anticuerpos y la secuencia de la línea germinal en FR4. En este ejemplo, L de la secuencia de anticuerpos puede retro-mutarse a la secuencia de la línea germinal de una F, y esta mutación puede combinarse con cualquiera de las combinaciones mostradas en la Tabla 6.

45 En el presente documento se describen las características que modifican uno o más de los aminoácidos en las regiones CDRs, es decir, CDR1, CDR2 y/o CDR3. En un ejemplo, se modifica la CDR3 de las cadenas pesadas, ligeras, o ambas, de un anticuerpo descrito en el presente documento. Normalmente, el aminoácido está sustituido con un aminoácido que tiene una cadena lateral similar (una sustitución de aminoácidos conservativa), de nuevo a la línea germinal, o puede estar sustituido con cualquier aminoácido apropiado tal como una alanina o una leucina. Por ejemplo, la CDR3 de 1.24.3, QQYSSPFT (SEQ ID NO: 48) puede modificarse en uno o más aminoácidos retro-mutando, por ejemplo, la secuencia de CDR3 a QQYYSPFT (SEQ ID NO:49).

50 También se describen en el presente documento las características que modifican el anticuerpo para eliminar cisteínas no emparejadas. Ejemplos de cisteínas no emparejadas aparecen en el anticuerpo 1.39.1 en el aminoácido 38, en el anticuerpo 1.96.1 en el aminoácido 38, y para el anticuerpo 1.140.1 en el aminoácido 38. Estas cisteínas pueden retro-mutarse a la línea germinal, por ejemplo, mutando C a Y o mutando C a cualquier aminoácido apropiado tal como una serina.

55

Tabla 4. Análisis de cadenas pesadas

Nombre de cadena	SEQ ID NO:	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	54	Línea germinal			EVQLVESGGGLVK PGSLRLSCAAS	GFTFS SYSMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICAR	# #DGNY #YFDY	WGQGT VTVSS
1.14.1	14	VH3-21	D5-24	JH4B	EVQLVESGGGLVK PGSLRLSCAAS	GFTFS SYSMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICAR	GGDGNY YFDY	WGQGT VTVSS
1.18.1	26	"	"	"	EVQLVESGGGLVK PGSLRLSCAAS	GFTFS SYSMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICAR	GGDGNY YFDY	WGQGT VTVSS
1.20.1 =1.19	30	"	"	"	EVQLVESGGGLVK PGSLRLSCAAS	GFTFS SYSMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICAR	GGDGNY YFDY	WGQGT VTVSS
1.24.3 =1.22.2 =1.71.1	38	"	"	"	EVQLVESGGGLVK PGSLRLSCAAS	GFTFS SYTMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICAR	GGDGNY YFDY	WGQGT VTVSS
1.39.1	34	"	"	"	EVQLVESGGGLVK PGSLRLSCAAS	GFTFS SYSMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICAR	GGDGNY YFDY	WGQGT VTVSS
1.96.2 =1.99 =1.104 =1.107 =1.128	22	"	"	"	EVQLVESGGGLVK PGSLRLSCAAS	GFTFS SYSMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICAR	GGDGNY YFDY	WGQGT VTVSS
1.100.1	18	"	"	"	EVQLVESGGGLVK PGSLRLSCAAS	GFTFS SYSMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICAR	GGDGNY YFDY	WGQGT VTVSS
1.140.1 =1.124 =1.148	6	"	"	"	EVQLVESGGGLVK PGSLRLSCAAS	GFTFS SYSMN	WVRQAPR KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICAR	GGDGNY YFDY	WGQGT VTVSS
	57	Línea germinal			EVQLVESGGGLVQ PGSLRLSCAAS	GFTFS SYWMS	WVRQAPG KGLEWVA	NIKQDSEKY YVDSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICAR#	# #YGM V	WGQGT VTVSS
1.43.1 =1.41 =1.22.1	10	VH3-7	D5-24	JH6B	EVQLVESGGGLVQ PGSLRLSCAAS	GFTFS SYWMS	WVRQTPG KGLEWVA	NIKQDSEKY YVDSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICAS	FRDYGMD V	WGQGT VTVSS
	59	Línea germinal			QVQLQESGPGLVK PSQTLTCTVTS	GGGIS SGGY WS	WIRQHPG KGLEWIG	YIYSGSTY NPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLK SSVTAADTAVYICAR	# #ITW RGVYIY YGMV	WGQGT VTVSS
1.44.1	2	VH4-31	D3-10	JH6B	QVQLQESGPGLVK PSQTLTCTVTS	GGGIS SGGY WS	WIRQHPG KGLEWIG	YIYSGSTY NPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLK SSVTAADTAVYICAR	EGPITIV RGVYIY YGMV	WGQGT VTVSS

56	Línea germinal			EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAAS	GFTFS SYDMH	WVRQATG KGLEWVS	AICTAGDTYY PGSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYYCAR	#GIS## YYYGMD V	WGQGIT VTVSS
1.71.2 =1.71.3	42	VH3-13	D6-19	JH6B	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCTAS	GFTFS SYDMH	WVRQATG KGLEWVS	AICTAGDTFY PGSVKG	EGYSSGR YFYGMD V	WGQGIT VTVSS

Tabla 4(a). Análisis de cadenas pesadas

Nombre de cadena	SEQ ID NO:	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	54	Línea germinal			EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFS	YSYMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYYCAR	##DGYNY #YFDY	WGQGIT VTVSS
1.14.1	14	VH3-21	D5-24	JH4B	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFS	YSYMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYYCAR	GGDGYNY YFDY	WGQGIT VTVSS
1.18.1	26	"	"	"	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFS	YSYMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYYCAR	GGDGYNY YFDY	WGQGIT VTVSS
1.20.1 =1.19	30	"	"	"	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFS	SYTMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYYCAR	GGDGYNY YFDY	WGQGIT VTVSS
1.24.3 =1.22.2 =1.71.1	38	"	"	"	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFS	YSYMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYYCAR	GGDGYNY YFDY	WGQGIT VTVSS
1.39.1	34	"	"	"	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFS	YSYMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYYCAR	GGDGYNY YFDY	WGQGIT VTVSS
1.96.2 =1.99 =1.104 =1.107 =1.128	22	"	"	"	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFS	YSYMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYYCAR	GGDGYNY YFDY	WGQGIT VTVSS
1.100.1	18	"	"	"	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFS	YSYMN	WVRQAPG KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYYCAR	GGDGYNY YFDY	WGQGIT VTVSS

1.140.1 =1.124 =1.148	6	"	"	"	EVQLVESGGGLV PGSRLRISCAASG FTFS	YSMN	WVRQAPR KGLEWVS	SISSSSYIY YADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICAR	GDDGYNY YFYDY	WGQGT VTVSS
	58	Línea germinal			EVQLVESGGGLVQ PGSRLRISCAASG FTFS	SYWMS	WVRQAPG KGLEWVA	NIKQDGSSEKY YVDSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICA#	#RDYGM V	WGQGT VTVSS
1.43.1 =1.41 =1.22.1		VH3-7	D5-24	JH6B	EVQLVESGGGLVQ PGSRLRISCAASG FTFS	SYWVH	WVRQTPG KGLEWVA	NIKQDGSSEKY YVDSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAEDTAVYICAS	FRDYGMD V	WGQGT VTVSS
	10	Línea germinal			QVQLQESGGPGLVK PSQITLSLCTVSG GSIS	SGGY WS	WIRQHPG KGLEWIG	YIYSGSTYY NPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYICAR	##ITMV RGVYIY YGMV	WGQGT VTVSS
1.44.1	2	VH4-31	D3-10	JH6B	QVQLQESGGPGLVK PSQITLSLCTVSG GSIS	SGGY WS	WIRQHPG KGLEWIG	YIYSGSTYY NPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYICAR	EGPITIV RGVYIY YGMV	WGQGT VTVSS
	56	Línea germinal			EVQLVESGGGLVQ PGSRLRISCAASG FTFS	SYDMH	WVRQATG KGLEWVS	AIGTAGDTYY PGSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAGDTAVYICAR	#GYSS## YIYGM V	WGQGT VTVSS
1.71.2 =1.71.3	42	VH3-13	D6-19	JH6B	EVQLVESGGGLVQ PGSRLRISCAASG FPFS	SYDMH	WVRQATG KGLEWVS	AIGTAGDTFY PGSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ NSLRAGDTAVYICAR	EGYSSGR YFYGM V	WGQGT VTVSS

Tabla 5. Análisis de cadenas ligeras

Nombre de cadena	SEQ ID NO:	V	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1.14.1	51	Línea germinal		DIYNTQSP DSLAVSLG ERATITC	KSSQSVLYSSNWKY LA	WYQQRPGQ PPQLLIY	WASTRES	GVPDFRFSGGS GTDFTLTITSSL QAEVYAVYIC	QQYYSTPFT	FGPGTKVDIK
		B3	JK3 (VK4)	DIYNTQSP DSLAVSLG ERATITC	KSSQSVYQNRQWNC LP	WYQQRPGQ PPQLLIY	WASTRES	GVPDFRFSGGS GTDFTLTITSSL QAEVYAVYIC	QQYFGSPFT	FGPGTKVDIK
1.18.1	28	"	"	DIYNTQSP DSLAVSLG ERATITC	KSSQSVTEHNRNC LA	WYQQRPGQ PPQLLIY	WASTRES	GVPDFRFSGGS GTDFTLTITSSL QAEVYAVYIC	QQYFGSPFT	FGPGTKVDIK
1.20.1 =1.19	32	"	"	DIYNTQSP DSLAVSLG ERATITC	KSSQSVFTFRNRNC LA	WYQQRPGQ PPQLLIY	WASTRES	GVPDFRFSGGS GTDFTLTITSSL QAEVYAVYIC	QQYFGSPFT	FGPGTKVDIK
1.24.3 =1.22.2 =1.71.1	40	"	"	DIYNTQSP DSLAVSLG ERATITC	KSSQSVFTFRNRNC LA	WYQQRPGQ PPQLLIY	WASTRES	GVPDFRFSGGS GTDFTLTITSSL QAEVYAVYIC	QQYFGSPFT	FGPGTKVDIK
1.39.1	36	"	"	DIYNTQSP DSLAVSLG ERATITC	KSSQSVFTFRNRNC LA	WYQQRPGQ PPQLLIY	WASTRES	GVPDFRFSGGS GTDFTLTITSSL QAEVYAVYIC	QQYFGSPFT	FGPGTKVDIK
1.96.2 =1.99 =1.104 =1.107 =1.128	24	"	"	DIYNTQSP DSLAVSLG ERATITC	KSSQSVTEHNRNC LA	WYQQRPGQ PPQLLIY	WASTRES	GVPDFRFSGGS GTDFTLTITSSL QAEVYAVYIC	QQYFGSPFT	FGPGTKVDIK
1.100.1	20	"	"	DIYNTQSP DSLAVSLG ERATITC	KSSQSVTEHNRNC LA	WYQQRPGQ PPQLLIY	WASTRES	GVPDFRFSGGS GTDFTLTITSSL QAEVYAVYIC	QQYFGSPFT	FGPGTKVDIK
1.140.1 =1.124 =1.148	8	"	"	DIYNTQSP DSLAVSLG ERATITC	KSSQSVFTFRNRNC LA	WYQQRPGQ PPQLLIY	WASTRES	GVPDFRFSGGS GTDFTLTITSSL QAEVYAVYIC	QQYFGSPFT	FGPGTKVDIK
1.43.1 =1.41 =1.22.1	50	Línea germinal		DIYNTQSP SSLASAVG DRVTITC	RASQGISNYLA	WFOQRPGK APKSLIY	AASSLQS	GVPSRFSGGS GTDFTLTITSSL QPEDFATYIC	QQYNSYPIT	FGQGTRELEIK
		L1	JK5 (VK1)	DIYNTQSP SSLASAVG DRVTITC	RASQGISNHILA	WFOQRPGK APKSLIY	QASSLQT	GVPSRFSGGS GTDFTLTITSSL QPEDFATYIC	QQYKGYPT	FGQGTRELEIK
1.44.1	4	A2	JK1 (VK2)	DIYNTQSP LSSLVTPG QPASISC	KSSQSLHSDGKTYL Y	WYQQRPGQ PPQLLIY	EVSNRFS	GVPDFRFSGGS GTDFTLTITSSL EAEDVGVYIC	MQSIQLPRT	FGQGTKEVEIK

Nombre de cadena	SEQ ID NO:	V	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	53	Línea germinal		DVVMTQSP LSLPVTLG QPASISC	RSSQSLIVYSDGNTYL N	WFQQRPGQ SPRRLLY	KVSNWDS	GVPDRFSGSGS GTFDTLKISRV EAEDEVGYVC	MQGTHW##T	FGGGTKVEIK
1.71.2 =1.71.3	44	A1	JK4	DVVMTQSP LSLPVTLG QPASISC	RSSQSLIVYSDGNTYL N	WFQQRPGQ SPRRLLY	KVSNWDS	GVPDRFSGSGS GTFDTLKISRV EAEDEVGYVC	MQGTHWPLT	FGGGTKVEIK

ES 2 661 952 T3

Tabla 6: Mutaciones a modo de ejemplo de 1.140 (SEQ ID NO: 8) Cadena ligera a línea germinal en el número de resto indicado

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	V	L	Y	C	K	K	Y	S	S
N	V	L	Y	C	K	K	Y	S	I
N	V	L	Y	C	K	K	Y	G	S
N	V	L	Y	C	K	K	Y	G	I
N	V	L	Y	C	K	K	F	S	S
N	V	L	Y	C	K	K	F	S	I
N	V	L	Y	C	K	K	F	G	S
N	V	L	Y	C	K	K	F	G	I
N	V	L	Y	C	K	N	Y	S	S
N	V	L	Y	C	K	N	Y	S	I
N	V	L	Y	C	K	N	Y	G	S
N	V	L	Y	C	K	N	Y	G	I
N	V	L	Y	C	K	N	F	S	S
N	V	L	Y	C	K	N	F	S	I
N	V	L	Y	C	K	N	F	G	S
N	V	L	Y	C	K	N	F	G	I
N	V	L	Y	C	R	K	Y	S	S
N	V	L	Y	C	R	K	Y	S	I
N	V	L	Y	C	R	K	Y	G	S
N	V	L	Y	C	R	K	Y	G	I
N	V	L	Y	C	R	K	F	S	S
N	V	L	Y	C	R	K	F	S	I
N	V	L	Y	C	R	K	F	G	S
N	V	L	Y	C	R	K	F	G	I
N	V	L	Y	C	R	N	Y	S	S
N	V	L	Y	C	R	N	Y	S	I
N	V	L	Y	C	R	N	Y	G	S
N	V	L	Y	C	R	N	Y	G	I
N	V	L	Y	C	R	N	F	S	S
N	V	L	Y	C	R	N	F	S	I
N	V	L	Y	C	R	N	F	G	S
N	V	L	Y	C	R	N	F	G	I
N	V	L	Y	Y	K	K	Y	S	S
N	V	L	Y	Y	K	K	Y	S	I
N	V	L	Y	Y	K	K	Y	G	S
N	V	L	Y	Y	K	K	Y	G	I
N	V	L	Y	Y	K	K	F	S	S
N	V	L	Y	Y	K	K	F	S	I
N	V	L	Y	Y	K	K	F	S	I
N	V	L	Y	Y	K	K	F	G	S
N	V	L	Y	Y	K	K	F	G	I
N	V	L	Y	Y	K	N	Y	S	S
N	V	L	Y	Y	K	N	Y	S	I
N	V	L	Y	Y	K	N	Y	G	S
N	V	L	Y	Y	K	N	Y	G	I
N	V	L	Y	Y	K	N	Y	S	S
N	V	L	Y	Y	K	N	Y	S	I
N	V	L	Y	Y	K	N	F	S	S
N	V	L	Y	Y	K	N	F	S	I
N	V	L	Y	Y	K	N	F	G	S
N	V	L	Y	Y	K	N	F	G	I
N	V	L	Y	Y	R	K	Y	S	S
N	V	L	Y	Y	R	K	Y	S	I
N	V	L	Y	Y	R	K	Y	G	S
N	V	L	Y	Y	R	K	Y	G	I
N	V	L	Y	Y	R	K	F	S	S
N	V	L	Y	Y	R	K	F	S	I
N	V	L	Y	Y	R	K	F	G	S
N	V	L	Y	Y	R	K	F	G	I
N	V	L	Y	Y	R	N	Y	S	S
N	V	L	Y	Y	R	N	Y	S	I
N	V	L	Y	Y	R	N	Y	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	V	L	R	Y	R	N	Y	S	I
N	V	L	R	Y	R	N	Y	G	S
N	V	L	R	Y	R	N	Y	G	I
N	V	L	R	Y	R	N	F	S	S
N	V	L	R	Y	R	N	F	S	I
N	V	L	R	Y	R	N	F	G	S
N	V	L	R	Y	R	N	F	G	I
N	V	F	Y	C	K	K	Y	S	S
N	V	F	Y	C	K	K	Y	S	I
N	V	F	Y	C	K	K	Y	G	S
N	V	F	Y	C	K	K	Y	G	I
N	V	F	Y	C	K	K	F	S	S
N	V	F	Y	C	K	K	F	S	I
N	V	F	Y	C	K	K	F	G	S
N	V	F	Y	C	K	K	F	G	I
N	V	F	Y	C	K	N	Y	S	S
N	V	F	Y	C	K	N	Y	S	I
N	V	F	Y	C	K	N	Y	G	S
N	V	F	Y	C	K	N	Y	G	I
N	V	F	Y	C	K	N	F	S	S
N	V	F	Y	C	K	N	F	S	I
N	V	F	Y	C	K	N	F	G	S
N	V	F	Y	C	K	N	F	G	I
N	V	F	Y	C	R	K	Y	S	S
N	V	F	Y	C	R	K	Y	S	I
N	V	F	Y	C	R	K	Y	G	S
N	V	F	Y	C	R	K	Y	G	I
N	V	F	Y	C	R	K	Y	S	S
N	V	F	Y	C	R	K	Y	S	I
N	V	F	Y	C	R	K	F	S	S
N	V	F	Y	C	R	K	F	S	I
N	V	F	Y	C	R	K	F	G	S
N	V	F	Y	C	R	K	F	G	I
N	V	F	Y	C	R	N	Y	S	S
N	V	F	Y	C	R	N	Y	S	I
N	V	F	Y	C	R	N	Y	G	S
N	V	F	Y	C	R	N	Y	G	I
N	V	F	Y	C	R	N	F	S	S
N	V	F	Y	C	R	N	F	S	I
N	V	F	Y	C	R	N	F	G	S
N	V	F	Y	C	R	N	F	G	I
N	V	F	Y	Y	K	K	Y	S	S
N	V	F	Y	Y	K	K	Y	S	I
N	V	F	Y	Y	K	K	Y	G	S
N	V	F	Y	Y	K	K	Y	G	I
N	V	F	Y	Y	K	K	F	S	S
N	V	F	Y	Y	K	K	F	S	I
N	V	F	Y	Y	K	K	F	G	S
N	V	F	Y	Y	K	K	F	G	I
N	V	F	Y	Y	K	N	Y	S	S
N	V	F	Y	Y	K	N	Y	S	I
N	V	F	Y	Y	K	N	Y	G	S
N	V	F	Y	Y	K	N	Y	G	I
N	V	F	Y	Y	K	N	F	S	S
N	V	F	Y	Y	K	N	F	S	I
N	V	F	Y	Y	K	N	F	G	S
N	V	F	Y	Y	K	N	F	G	I
N	V	F	Y	Y	R	K	Y	S	S
N	V	F	Y	Y	R	K	Y	S	I
N	V	F	Y	Y	R	K	Y	G	S
N	V	F	Y	Y	R	K	Y	G	I
N	V	F	Y	Y	R	K	F	S	S
N	V	F	Y	Y	R	K	F	S	I
N	V	F	Y	Y	R	K	F	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	V	F	Y	Y	R	K	F	G	I
N	V	F	Y	Y	R	N	Y	S	S
N	V	F	Y	Y	R	N	Y	S	I
N	V	F	Y	Y	R	N	Y	G	S
N	V	F	Y	Y	R	N	Y	G	I
N	V	F	Y	Y	R	N	F	S	S
N	V	F	Y	Y	R	N	F	S	I
N	V	F	Y	Y	R	N	F	G	S
N	V	F	Y	Y	R	N	F	G	I
N	V	F	R	C	K	K	Y	S	S
N	V	F	R	C	K	K	Y	S	I
N	V	F	R	C	K	K	Y	G	S
N	V	F	R	C	K	K	Y	G	I
N	V	F	R	C	K	K	F	S	S
N	V	F	R	C	K	K	F	S	I
N	V	F	R	C	K	K	F	G	S
N	V	F	R	C	K	K	F	G	I
N	V	F	R	C	K	N	Y	S	S
N	V	F	R	C	K	N	Y	S	I
N	V	F	R	C	K	N	Y	G	S
N	V	F	R	C	K	N	Y	G	I
N	V	F	R	C	K	N	F	S	S
N	V	F	R	C	K	N	F	S	I
N	V	F	R	C	K	N	F	G	S
N	V	F	R	C	K	N	F	G	I
N	V	F	R	C	R	K	Y	S	S
N	V	F	R	C	R	K	Y	S	I
N	V	F	R	C	R	K	Y	G	S
N	V	F	R	C	R	K	Y	G	I
N	V	F	R	C	R	K	F	S	S
N	V	F	R	C	R	K	F	S	I
N	V	F	R	C	R	K	F	G	S
N	V	F	R	C	R	K	F	G	I
N	V	F	R	C	R	N	Y	S	S
N	V	F	R	C	R	N	Y	S	I
N	V	F	R	C	R	N	Y	G	S
N	V	F	R	C	R	N	Y	G	I
N	V	F	R	C	R	N	F	S	S
N	V	F	R	C	R	N	F	S	I
N	V	F	R	C	R	N	F	G	S
N	V	F	R	C	R	N	F	G	I
N	V	F	R	Y	K	K	Y	S	S
N	V	F	R	Y	K	K	Y	S	I
N	V	F	R	Y	K	K	Y	G	S
N	V	F	R	Y	K	K	Y	G	I
N	V	F	R	Y	K	K	F	S	S
N	V	F	R	Y	K	K	F	S	I
N	V	F	R	Y	K	K	F	G	S
N	V	F	R	Y	K	K	F	G	I
N	V	F	R	Y	K	N	Y	S	S
N	V	F	R	Y	K	N	Y	S	I
N	V	F	R	Y	K	N	Y	G	S
N	V	F	R	Y	K	N	Y	G	I
N	V	F	R	Y	K	N	F	S	S
N	V	F	R	Y	K	N	F	S	I
N	V	F	R	Y	K	N	F	G	S
N	V	F	R	Y	K	N	F	G	I
N	V	F	R	Y	K	N	F	S	S
N	V	F	R	Y	K	N	F	S	I
N	V	F	R	Y	K	N	F	G	S
N	V	F	R	Y	K	N	F	G	I
N	V	F	R	Y	R	K	Y	S	S
N	V	F	R	Y	R	K	Y	S	I
N	V	F	R	Y	R	K	Y	G	S
N	V	F	R	Y	R	K	Y	G	I
N	V	F	R	Y	R	K	F	S	S
N	V	F	R	Y	R	K	F	S	I

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	V	F	R	Y	R	K	F	S	I
N	V	F	R	Y	R	K	F	G	S
N	V	F	R	Y	R	K	F	G	I
N	V	F	R	Y	R	N	Y	S	S
N	V	F	R	Y	R	N	Y	S	I
N	V	F	R	Y	R	N	Y	G	S
N	V	F	R	Y	R	N	Y	G	I
N	V	F	R	Y	R	N	F	S	S
N	V	F	R	Y	R	N	F	S	I
N	V	F	R	Y	R	N	F	G	S
N	V	F	R	Y	R	N	F	G	I
N	F	L	Y	C	K	K	Y	S	S
N	F	L	Y	C	K	K	Y	S	I
N	F	L	Y	C	K	K	Y	G	S
N	F	L	Y	C	K	K	Y	G	I
N	F	L	Y	C	K	K	F	S	S
N	F	L	Y	C	K	K	F	S	I
N	F	L	Y	C	K	K	F	G	S
N	F	L	Y	C	K	K	F	G	I
N	F	L	Y	C	K	N	Y	S	S
N	F	L	Y	C	K	N	Y	S	I
N	F	L	Y	C	K	N	Y	G	S
N	F	L	Y	C	K	N	Y	G	I
N	F	L	Y	C	K	N	F	S	S
N	F	L	Y	C	K	N	F	S	I
N	F	L	Y	C	K	N	F	G	S
N	F	L	Y	C	K	N	F	G	I
N	F	L	Y	C	K	N	F	S	S
N	F	L	Y	C	K	N	F	S	I
N	F	L	Y	C	R	K	Y	S	S
N	F	L	Y	C	R	K	Y	S	I
N	F	L	Y	C	R	K	Y	G	S
N	F	L	Y	C	R	K	Y	G	I
N	F	L	Y	C	R	K	F	S	S
N	F	L	Y	C	R	K	F	S	I
N	F	L	Y	C	R	K	F	G	S
N	F	L	Y	C	R	K	F	G	I
N	F	L	Y	C	R	N	Y	S	S
N	F	L	Y	C	R	N	Y	S	I
N	F	L	Y	C	R	N	Y	G	S
N	F	L	Y	C	R	N	Y	G	I
N	F	L	Y	C	R	N	F	S	S
N	F	L	Y	C	R	N	F	S	I
N	F	L	Y	C	R	N	F	G	S
N	F	L	Y	C	R	N	F	G	I
N	F	L	Y	Y	K	K	Y	S	S
N	F	L	Y	Y	K	K	Y	S	I
N	F	L	Y	Y	K	K	Y	G	S
N	F	L	Y	Y	K	K	Y	G	I
N	F	L	Y	Y	K	K	F	S	S
N	F	L	Y	Y	K	K	F	S	I
N	F	L	Y	Y	K	K	F	G	S
N	F	L	Y	Y	K	K	F	G	I
N	F	L	Y	Y	K	N	Y	S	S
N	F	L	Y	Y	K	N	Y	S	I
N	F	L	Y	Y	K	N	Y	G	S
N	F	L	Y	Y	K	N	Y	G	I
N	F	L	Y	Y	K	N	F	S	S
N	F	L	Y	Y	K	N	F	S	I
N	F	L	Y	Y	K	N	F	G	S
N	F	L	Y	Y	K	N	F	G	I
N	F	L	Y	Y	R	K	Y	S	S
N	F	L	Y	Y	R	K	Y	S	I
N	F	L	Y	Y	R	K	Y	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	F	L	Y	Y	R	K	Y	G	I
N	F	L	Y	Y	R	K	F	S	S
N	F	L	Y	Y	R	K	F	S	I
N	F	L	Y	Y	R	K	F	G	S
N	F	L	Y	Y	R	K	F	G	I
N	F	L	Y	Y	R	N	Y	S	S
N	F	L	Y	Y	R	N	Y	S	I
N	F	L	Y	Y	R	N	Y	G	S
N	F	L	Y	Y	R	N	Y	G	I
N	F	L	Y	Y	R	N	F	S	S
N	F	L	Y	Y	R	N	F	S	I
N	F	L	Y	Y	R	N	F	G	S
N	F	L	Y	Y	R	N	F	G	I
N	F	L	R	C	K	K	Y	S	S
N	F	L	R	C	K	K	Y	S	I
N	F	L	R	C	K	K	Y	G	S
N	F	L	R	C	K	K	Y	G	I
N	F	L	R	C	K	K	F	S	S
N	F	L	R	C	K	K	F	S	I
N	F	L	R	C	K	K	F	G	S
N	F	L	R	C	K	K	F	G	I
N	F	L	R	C	K	N	Y	S	S
N	F	L	R	C	K	N	Y	S	I
N	F	L	R	C	K	N	Y	G	S
N	F	L	R	C	K	N	Y	G	I
N	F	L	R	C	K	N	F	S	S
N	F	L	R	C	K	N	F	S	I
N	F	L	R	C	K	N	F	S	G
N	F	L	R	C	K	N	F	G	S
N	F	L	R	C	R	K	Y	S	S
N	F	L	R	C	R	K	Y	S	I
N	F	L	R	C	R	K	Y	G	S
N	F	L	R	C	R	K	Y	G	I
N	F	L	R	C	R	K	F	S	S
N	F	L	R	C	R	K	F	S	I
N	F	L	R	C	R	K	F	G	S
N	F	L	R	C	R	K	F	G	I
N	F	L	R	C	R	K	F	G	S
N	F	L	R	C	R	N	Y	S	S
N	F	L	R	C	R	N	Y	S	I
N	F	L	R	C	R	N	Y	G	S
N	F	L	R	C	R	N	Y	G	I
N	F	L	R	C	R	N	F	S	S
N	F	L	R	C	R	N	F	S	I
N	F	L	R	C	R	N	F	G	S
N	F	L	R	C	R	N	F	G	I
N	F	L	R	Y	K	K	Y	S	S
N	F	L	R	Y	K	K	Y	S	I
N	F	L	R	Y	K	K	Y	G	S
N	F	L	R	Y	K	K	Y	G	I
N	F	L	R	Y	K	K	F	S	S
N	F	L	R	Y	K	K	F	S	I
N	F	L	R	Y	K	K	F	G	S
N	F	L	R	Y	K	K	F	G	I
N	F	L	R	Y	K	N	Y	S	S
N	F	L	R	Y	K	N	Y	S	I
N	F	L	R	Y	K	N	Y	G	S
N	F	L	R	Y	K	N	Y	G	I
N	F	L	R	Y	K	N	F	S	S
N	F	L	R	Y	K	N	F	S	I
N	F	L	R	Y	K	N	F	G	S
N	F	L	R	Y	K	N	F	G	I
N	F	L	R	Y	R	K	Y	S	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	F	F	Y	Y	K	N	F	G	I
N	F	F	Y	Y	R	K	Y	S	S
N	F	F	Y	Y	R	K	Y	S	I
N	F	F	Y	Y	R	K	Y	G	S
N	F	F	Y	Y	R	K	Y	G	I
N	F	F	Y	Y	R	K	F	S	S
N	F	F	Y	Y	R	K	F	S	I
N	F	F	Y	Y	R	K	F	G	S
N	F	F	Y	Y	R	K	F	G	I
N	F	F	Y	Y	R	N	Y	S	S
N	F	F	Y	Y	R	N	Y	S	I
N	F	F	Y	Y	R	N	Y	G	S
N	F	F	Y	Y	R	N	Y	G	I
N	F	F	Y	Y	R	N	F	S	S
N	F	F	Y	Y	R	N	F	S	I
N	F	F	Y	Y	R	N	F	G	S
N	F	F	Y	Y	R	N	F	G	I
N	F	F	R	C	K	K	Y	S	S
N	F	F	R	C	K	K	Y	S	I
N	F	F	R	C	K	K	Y	G	S
N	F	F	R	C	K	K	Y	G	I
N	F	F	R	C	K	K	F	S	S
N	F	F	R	C	K	K	F	S	I
N	F	F	R	C	K	K	F	G	S
N	F	F	R	C	K	K	F	G	I
N	F	F	R	C	K	N	Y	S	S
N	F	F	R	C	K	N	Y	S	I
N	F	F	R	C	K	N	Y	G	S
N	F	F	R	C	K	N	Y	G	I
N	F	F	R	C	K	N	F	S	S
N	F	F	R	C	K	N	F	S	I
N	F	F	R	C	K	N	F	G	S
N	F	F	R	C	K	N	F	G	I
N	F	F	R	C	R	K	Y	S	S
N	F	F	R	C	R	K	Y	S	I
N	F	F	R	C	R	K	Y	G	S
N	F	F	R	C	R	K	Y	G	I
N	F	F	R	C	R	K	Y	S	S
N	F	F	R	C	R	K	F	S	I
N	F	F	R	C	R	K	F	G	S
N	F	F	R	C	R	K	F	G	I
N	F	F	R	C	R	N	Y	S	S
N	F	F	R	C	R	N	Y	S	I
N	F	F	R	C	R	N	Y	G	S
N	F	F	R	C	R	N	Y	G	I
N	F	F	R	C	R	N	F	S	S
N	F	F	R	C	R	N	F	S	I
N	F	F	R	C	R	N	F	G	S
N	F	F	R	Y	K	K	Y	S	S
N	F	F	R	Y	K	K	Y	S	I
N	F	F	R	Y	K	K	Y	G	S
N	F	F	R	Y	K	K	Y	G	I
N	F	F	R	Y	K	K	F	S	S
N	F	F	R	Y	K	K	F	S	I
N	F	F	R	Y	K	K	F	G	S
N	F	F	R	Y	K	K	F	G	I
N	F	F	R	Y	K	N	Y	S	S
N	F	F	R	Y	K	N	Y	S	I
N	F	F	R	Y	K	N	Y	G	S
N	F	F	R	Y	K	N	Y	G	I
N	F	F	R	Y	K	N	F	S	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	F	F	R	Y	K	N	F	S	I
N	F	F	R	Y	K	N	F	G	S
N	F	F	R	Y	K	N	F	G	I
N	F	F	R	Y	R	K	Y	S	S
N	F	F	R	Y	R	K	Y	S	I
N	F	F	R	Y	R	K	Y	G	S
N	F	F	R	Y	R	K	Y	G	I
N	F	F	R	Y	R	K	F	S	S
N	F	F	R	Y	R	K	F	S	I
N	F	F	R	Y	R	K	F	G	S
N	F	F	R	Y	R	K	F	G	I
N	F	F	R	Y	R	N	Y	S	S
N	F	F	R	Y	R	N	Y	S	I
N	F	F	R	Y	R	N	Y	G	S
N	F	F	R	Y	R	N	Y	G	I
N	F	F	R	Y	R	N	F	S	S
N	F	F	R	Y	R	N	F	S	I
N	F	F	R	Y	R	N	F	G	S
N	F	F	R	Y	R	N	F	G	I
T	V	L	Y	C	K	K	Y	S	S
T	V	L	Y	C	K	K	Y	S	I
T	V	L	Y	C	K	K	Y	G	S
T	V	L	Y	C	K	K	Y	G	I
T	V	L	Y	C	K	K	F	S	S
T	V	L	Y	C	K	K	F	S	I
T	V	L	Y	C	K	K	F	G	S
T	V	L	Y	C	K	K	F	G	I
T	V	L	Y	C	K	N	Y	S	S
T	V	L	Y	C	K	N	Y	S	I
T	V	L	Y	C	K	N	Y	G	S
T	V	L	Y	C	K	N	Y	G	I
T	V	L	Y	C	K	N	F	S	S
T	V	L	Y	C	K	N	F	S	I
T	V	L	Y	C	K	N	F	G	S
T	V	L	Y	C	K	N	F	G	I
T	V	L	Y	C	R	K	Y	S	S
T	V	L	Y	C	R	K	Y	S	I
T	V	L	Y	C	R	K	Y	G	S
T	V	L	Y	C	R	K	Y	G	I
T	V	L	Y	C	R	K	F	S	S
T	V	L	Y	C	R	K	F	S	I
T	V	L	Y	C	R	K	F	G	S
T	V	L	Y	C	R	K	F	G	I
T	V	L	Y	C	R	N	Y	S	S
T	V	L	Y	C	R	N	Y	S	I
T	V	L	Y	C	R	N	Y	G	S
T	V	L	Y	C	R	N	Y	G	I
T	V	L	Y	C	R	N	F	S	S
T	V	L	Y	C	R	N	F	S	I
T	V	L	Y	C	R	N	F	G	S
T	V	L	Y	C	R	N	F	G	I
T	V	L	Y	Y	K	K	Y	S	S
T	V	L	Y	Y	K	K	Y	S	I
T	V	L	Y	Y	K	K	Y	G	S
T	V	L	Y	Y	K	K	Y	G	I
T	V	L	Y	Y	K	K	F	S	S
T	V	L	Y	Y	K	K	F	S	I
T	V	L	Y	Y	K	K	F	G	S
T	V	L	Y	Y	K	K	F	G	I
T	V	L	Y	Y	K	N	Y	S	S
T	V	L	Y	Y	K	N	Y	S	I
T	V	L	Y	Y	K	N	Y	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	V	L	Y	Y	K	N	Y	G	I
T	V	L	Y	Y	K	N	F	S	S
T	V	L	Y	Y	K	N	F	S	I
T	V	L	Y	Y	K	N	F	G	S
T	V	L	Y	Y	K	N	F	G	I
T	V	L	Y	Y	R	K	Y	S	S
T	V	L	Y	Y	R	K	Y	S	I
T	V	L	Y	Y	R	K	Y	G	S
T	V	L	Y	Y	R	K	Y	G	I
T	V	L	Y	Y	R	K	F	S	S
T	V	L	Y	Y	R	K	F	S	I
T	V	L	Y	Y	R	K	F	G	S
T	V	L	Y	Y	R	K	F	G	I
T	V	L	Y	Y	R	N	Y	S	S
T	V	L	Y	Y	R	N	Y	S	I
T	V	L	Y	Y	R	N	Y	G	S
T	V	L	Y	Y	R	N	Y	G	I
T	V	L	Y	Y	R	N	F	S	S
T	V	L	Y	Y	R	N	F	S	I
T	V	L	Y	Y	R	N	F	G	S
T	V	L	Y	Y	R	N	F	G	I
T	V	L	R	C	K	K	Y	S	S
T	V	L	R	C	K	K	Y	S	I
T	V	L	R	C	K	K	Y	G	S
T	V	L	R	C	K	K	Y	G	I
T	V	L	R	C	K	K	F	S	S
T	V	L	R	C	K	K	F	S	I
T	V	L	R	C	K	K	F	G	S
T	V	L	R	C	K	K	F	G	I
T	V	L	R	C	K	N	Y	S	S
T	V	L	R	C	K	N	Y	S	I
T	V	L	R	C	K	N	Y	G	S
T	V	L	R	C	K	N	Y	G	I
T	V	L	R	C	K	N	F	S	S
T	V	L	R	C	K	N	F	S	I
T	V	L	R	C	K	N	F	G	S
T	V	L	R	C	K	N	F	G	I
T	V	L	R	C	R	K	Y	S	S
T	V	L	R	C	R	K	Y	S	I
T	V	L	R	C	R	K	Y	G	S
T	V	L	R	C	R	K	Y	G	I
T	V	L	R	C	R	K	F	S	S
T	V	L	R	C	R	K	F	S	I
T	V	L	R	C	R	K	F	G	S
T	V	L	R	C	R	K	F	G	I
T	V	L	R	C	R	N	Y	S	S
T	V	L	R	C	R	N	Y	S	I
T	V	L	R	C	R	N	Y	G	S
T	V	L	R	C	R	N	Y	G	I
T	V	L	R	C	R	N	F	S	S
T	V	L	R	C	R	N	F	S	I
T	V	L	R	C	R	N	F	G	S
T	V	L	R	C	R	N	F	G	I
T	V	L	R	Y	K	K	Y	S	S
T	V	L	R	Y	K	K	Y	S	I
T	V	L	R	Y	K	K	Y	G	S
T	V	L	R	Y	K	K	Y	G	I
T	V	L	R	Y	K	K	F	S	S
T	V	L	R	Y	K	K	F	S	I
T	V	L	R	Y	K	K	F	G	S
T	V	L	R	Y	K	K	F	G	I
T	V	L	R	Y	K	N	Y	S	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	V	L	R	Y	K	N	Y	S	I
T	V	L	R	Y	K	N	Y	G	S
T	V	L	R	Y	K	N	Y	G	I
T	V	L	R	Y	K	N	F	S	S
T	V	L	R	Y	K	N	F	S	I
T	V	L	R	Y	K	N	F	G	S
T	V	L	R	Y	K	N	F	G	I
T	V	L	R	Y	R	K	Y	S	S
T	V	L	R	Y	R	K	Y	S	I
T	V	L	R	Y	R	K	Y	G	S
T	V	L	R	Y	R	K	Y	G	I
T	V	L	R	Y	R	K	F	S	S
T	V	L	R	Y	R	K	F	S	I
T	V	L	R	Y	R	K	F	G	S
T	V	L	R	Y	R	K	F	G	I
T	V	L	R	Y	R	N	Y	S	S
T	V	L	R	Y	R	N	Y	S	I
T	V	L	R	Y	R	N	Y	G	S
T	V	L	R	Y	R	N	Y	G	I
T	V	L	R	Y	R	N	F	S	S
T	V	L	R	Y	R	N	F	S	I
T	V	L	R	Y	R	N	F	G	S
T	V	L	R	Y	R	N	F	G	I
T	V	F	Y	C	K	K	Y	S	S
T	V	F	Y	C	K	K	Y	S	I
T	V	F	Y	C	K	K	Y	G	S
T	V	F	Y	C	K	K	Y	G	I
T	V	F	Y	C	K	K	Y	S	S
T	V	F	Y	C	K	K	F	S	S
T	V	F	Y	C	K	K	F	S	I
T	V	F	Y	C	K	K	F	G	S
T	V	F	Y	C	K	N	Y	S	S
T	V	F	Y	C	K	N	Y	S	I
T	V	F	Y	C	K	N	Y	G	S
T	V	F	Y	C	K	N	Y	G	I
T	V	F	Y	C	K	N	F	S	S
T	V	F	Y	C	K	N	F	S	I
T	V	F	Y	C	R	K	Y	S	S
T	V	F	Y	C	R	K	Y	S	I
T	V	F	Y	C	R	K	Y	G	S
T	V	F	Y	C	R	K	Y	G	I
T	V	F	Y	C	R	K	F	S	S
T	V	F	Y	C	R	K	F	S	I
T	V	F	Y	C	R	K	F	G	S
T	V	F	Y	C	R	K	F	G	I
T	V	F	Y	C	R	N	Y	S	S
T	V	F	Y	C	R	N	Y	S	I
T	V	F	Y	C	R	N	Y	G	S
T	V	F	Y	C	R	N	Y	G	I
T	V	F	Y	C	R	N	F	S	S
T	V	F	Y	C	R	N	F	S	I
T	V	F	Y	C	R	N	F	G	S
T	V	F	Y	C	R	N	F	G	I
T	V	F	Y	Y	K	K	Y	S	S
T	V	F	Y	Y	K	K	Y	S	I
T	V	F	Y	Y	K	K	Y	G	S
T	V	F	Y	Y	K	K	Y	G	I
T	V	F	Y	Y	K	K	F	S	S
T	V	F	Y	Y	K	K	F	S	I
T	V	F	Y	Y	K	K	F	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	V	F	Y	Y	K	K	F	G	I
T	V	F	Y	Y	K	N	Y	S	S
T	V	F	Y	Y	K	N	Y	S	I
T	V	F	Y	Y	K	N	Y	G	S
T	V	F	Y	Y	K	N	Y	G	I
T	V	F	Y	Y	K	N	F	S	S
T	V	F	Y	Y	K	N	F	S	I
T	V	F	Y	Y	K	N	F	G	S
T	V	F	Y	Y	K	N	F	G	I
T	V	F	Y	Y	R	K	Y	S	S
T	V	F	Y	Y	R	K	Y	S	I
T	V	F	Y	Y	R	K	Y	G	S
T	V	F	Y	Y	R	K	Y	G	I
T	V	F	Y	Y	R	K	F	S	S
T	V	F	Y	Y	R	K	F	S	I
T	V	F	Y	Y	R	K	F	G	S
T	V	F	Y	Y	R	K	F	G	I
T	V	F	Y	Y	R	K	F	S	S
T	V	F	Y	Y	R	N	Y	S	S
T	V	F	Y	Y	R	N	Y	S	I
T	V	F	Y	Y	R	N	Y	G	S
T	V	F	Y	Y	R	N	Y	G	I
T	V	F	Y	Y	R	N	F	S	S
T	V	F	Y	Y	R	N	F	S	I
T	V	F	Y	Y	R	N	F	G	S
T	V	F	Y	Y	R	N	F	G	I
T	V	F	Y	Y	R	N	F	G	S
T	V	F	Y	Y	R	N	F	G	I
T	V	F	R	C	K	K	Y	S	S
T	V	F	R	C	K	K	Y	S	I
T	V	F	R	C	K	K	Y	G	S
T	V	F	R	C	K	K	Y	G	I
T	V	F	R	C	K	K	F	S	S
T	V	F	R	C	K	K	F	S	I
T	V	F	R	C	K	K	F	G	S
T	V	F	R	C	K	K	F	G	I
T	V	F	R	C	K	N	Y	S	S
T	V	F	R	C	K	N	Y	S	I
T	V	F	R	C	K	N	Y	G	S
T	V	F	R	C	K	N	Y	G	I
T	V	F	R	C	K	N	Y	G	S
T	V	F	R	C	K	N	Y	G	I
T	V	F	R	C	R	K	Y	S	S
T	V	F	R	C	R	K	Y	S	I
T	V	F	R	C	R	K	Y	G	S
T	V	F	R	C	R	K	Y	G	I
T	V	F	R	C	R	K	F	S	S
T	V	F	R	C	R	K	F	S	I
T	V	F	R	C	R	K	F	S	S
T	V	F	R	C	R	K	F	G	S
T	V	F	R	C	R	K	F	G	I
T	V	F	R	C	R	N	Y	S	S
T	V	F	R	C	R	N	Y	S	I
T	V	F	R	C	R	N	Y	G	S
T	V	F	R	C	R	N	Y	G	I
T	V	F	R	C	R	N	F	S	S
T	V	F	R	C	R	N	F	S	I
T	V	F	R	C	R	N	F	G	S
T	V	F	R	C	R	N	F	G	I
T	V	F	R	Y	K	K	Y	S	S
T	V	F	R	Y	K	K	Y	S	I
T	V	F	R	Y	K	K	Y	G	S
T	V	F	R	Y	K	K	Y	G	I
T	V	F	R	Y	K	K	F	S	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	V	F	R	Y	K	K	F	S	I
T	V	F	R	Y	K	K	F	G	S
T	V	F	R	Y	K	K	F	G	I
T	V	F	R	Y	K	N	Y	S	S
T	V	F	R	Y	K	N	Y	S	I
T	V	F	R	Y	K	N	Y	G	S
T	V	F	R	Y	K	N	Y	G	I
T	V	F	R	Y	K	N	F	S	S
T	V	F	R	Y	K	N	F	S	I
T	V	F	R	Y	K	N	F	G	S
T	V	F	R	Y	K	N	F	G	I
T	V	F	R	Y	R	K	Y	S	S
T	V	F	R	Y	R	K	Y	S	I
T	V	F	R	Y	R	K	Y	G	S
T	V	F	R	Y	R	K	Y	G	I
T	V	F	R	Y	R	K	F	S	S
T	V	F	R	Y	R	K	F	S	I
T	V	F	R	Y	R	K	F	G	S
T	V	F	R	Y	R	N	Y	S	S
T	V	F	R	Y	R	N	Y	S	I
T	V	F	R	Y	R	N	Y	G	S
T	V	F	R	Y	R	N	Y	G	I
T	V	F	R	Y	R	N	F	S	S
T	V	F	R	Y	R	N	F	S	I
T	V	F	R	Y	R	N	F	G	S
T	V	F	R	Y	R	N	F	G	I
T	F	L	Y	C	K	K	Y	S	S
T	F	L	Y	C	K	K	Y	S	I
T	F	L	Y	C	K	K	Y	G	S
T	F	L	Y	C	K	K	Y	G	I
T	F	L	Y	C	K	K	F	S	S
T	F	L	Y	C	K	K	F	S	I
T	F	L	Y	C	K	K	F	G	S
T	F	L	Y	C	K	N	Y	S	S
T	F	L	Y	C	K	N	Y	S	I
T	F	L	Y	C	K	N	Y	G	S
T	F	L	Y	C	K	N	F	S	S
T	F	L	Y	C	K	N	F	S	I
T	F	L	Y	C	K	N	F	G	S
T	F	L	Y	C	K	N	F	G	I
T	F	L	Y	C	R	K	Y	S	S
T	F	L	Y	C	R	K	Y	S	I
T	F	L	Y	C	R	K	Y	G	S
T	F	L	Y	C	R	K	Y	G	I
T	F	L	Y	C	R	K	Y	S	S
T	F	L	Y	C	R	K	F	S	S
T	F	L	Y	C	R	K	F	S	I
T	F	L	Y	C	R	K	F	G	S
T	F	L	Y	C	R	K	F	G	I
T	F	L	Y	C	R	N	Y	S	S
T	F	L	Y	C	R	N	Y	S	I
T	F	L	Y	C	R	N	Y	G	S
T	F	L	Y	C	R	N	Y	G	I
T	F	L	Y	C	R	N	F	S	S
T	F	L	Y	C	R	N	F	S	I
T	F	L	Y	C	R	N	F	G	S
T	F	L	Y	C	R	N	F	G	I
T	F	L	Y	Y	K	K	Y	S	S
T	F	L	Y	Y	K	K	Y	S	I
T	F	L	Y	Y	K	K	Y	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	F	L	Y	Y	K	K	Y	G	I
T	F	L	Y	Y	K	K	F	S	S
T	F	L	Y	Y	K	K	F	S	I
T	F	L	Y	Y	K	K	F	G	S
T	F	L	Y	Y	K	K	F	G	I
T	F	L	Y	Y	K	N	Y	S	S
T	F	L	Y	Y	K	N	Y	S	I
T	F	L	Y	Y	K	N	Y	G	S
T	F	L	Y	Y	K	N	Y	G	I
T	F	L	Y	Y	K	N	F	S	S
T	F	L	Y	Y	K	N	F	S	I
T	F	L	Y	Y	K	N	F	G	S
T	F	L	Y	Y	K	N	F	G	I
T	F	L	Y	Y	R	K	Y	S	S
T	F	L	Y	Y	R	K	Y	S	I
T	F	L	Y	Y	R	K	Y	G	S
T	F	L	Y	Y	R	K	Y	G	I
T	F	L	Y	Y	R	K	F	S	S
T	F	L	Y	Y	R	K	F	S	I
T	F	L	Y	Y	R	K	F	G	S
T	F	L	Y	Y	R	K	F	G	I
T	F	L	Y	Y	R	N	Y	S	S
T	F	L	Y	Y	R	N	Y	S	I
T	F	L	Y	Y	R	N	Y	G	S
T	F	L	Y	Y	R	N	Y	G	I
T	F	L	Y	Y	R	N	F	S	S
T	F	L	Y	Y	R	N	F	S	I
T	F	L	Y	Y	R	N	F	S	S
T	F	L	Y	Y	R	N	F	S	I
T	F	L	Y	Y	R	N	F	S	S
T	F	L	Y	Y	R	N	F	S	I
T	F	L	Y	Y	R	N	F	S	S
T	F	L	Y	Y	R	N	F	S	I
T	F	L	R	C	K	K	Y	S	S
T	F	L	R	C	K	K	Y	S	I
T	F	L	R	C	K	K	Y	G	S
T	F	L	R	C	K	K	Y	G	I
T	F	L	R	C	K	K	F	S	S
T	F	L	R	C	K	K	F	S	I
T	F	L	R	C	K	K	F	G	S
T	F	L	R	C	K	K	F	G	I
T	F	L	R	C	K	K	F	G	S
T	F	L	R	C	K	N	Y	S	S
T	F	L	R	C	K	N	Y	S	I
T	F	L	R	C	K	N	Y	G	S
T	F	L	R	C	K	N	Y	G	I
T	F	L	R	C	K	N	F	S	S
T	F	L	R	C	K	N	F	S	I
T	F	L	R	C	K	N	F	G	S
T	F	L	R	C	K	N	F	G	I
T	F	L	R	C	R	K	Y	S	S
T	F	L	R	C	R	K	Y	S	I
T	F	L	R	C	R	K	Y	G	S
T	F	L	R	C	R	K	Y	G	I
T	F	L	R	C	R	K	Y	G	S
T	F	L	R	C	R	K	F	S	S
T	F	L	R	C	R	K	F	S	I
T	F	L	R	C	R	K	F	G	S
T	F	L	R	C	R	K	F	G	I
T	F	L	R	C	R	N	Y	S	S
T	F	L	R	C	R	N	Y	S	I
T	F	L	R	C	R	N	Y	G	S
T	F	L	R	C	R	N	Y	G	I
T	F	L	R	C	R	N	F	S	S
T	F	L	R	C	R	N	F	S	I
T	F	L	R	C	R	N	F	G	S
T	F	L	R	C	R	N	F	G	I
T	F	L	R	Y	K	K	Y	S	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	F	L	R	Y	K	K	Y	S	I
T	F	L	R	Y	K	K	Y	G	S
T	F	L	R	Y	K	K	Y	G	I
T	F	L	R	Y	K	K	F	S	S
T	F	L	R	Y	K	K	F	S	I
T	F	L	R	Y	K	K	F	G	S
T	F	L	R	Y	K	K	F	G	I
T	F	L	R	Y	K	N	Y	S	S
T	F	L	R	Y	K	N	Y	S	I
T	F	L	R	Y	K	N	Y	G	S
T	F	L	R	Y	K	N	Y	G	I
T	F	L	R	Y	K	N	F	S	S
T	F	L	R	Y	K	N	F	S	I
T	F	L	R	Y	K	N	F	G	S
T	F	L	R	Y	K	N	F	G	I
T	F	L	R	Y	R	K	Y	S	S
T	F	L	R	Y	R	K	Y	S	I
T	F	L	R	Y	R	K	Y	G	S
T	F	L	R	Y	R	K	Y	G	I
T	F	L	R	Y	R	K	F	S	S
T	F	L	R	Y	R	K	F	S	I
T	F	L	R	Y	R	K	F	G	S
T	F	L	R	Y	R	K	F	G	I
T	F	L	R	Y	R	N	Y	S	S
T	F	L	R	Y	R	N	Y	S	I
T	F	L	R	Y	R	N	Y	G	S
T	F	L	R	Y	R	N	Y	G	I
T	F	L	R	Y	R	N	F	S	S
T	F	L	R	Y	R	N	F	S	I
T	F	L	R	Y	R	N	F	G	S
T	F	L	R	Y	R	N	F	G	I
T	F	F	Y	C	K	K	Y	S	S
T	F	F	Y	C	K	K	Y	S	I
T	F	F	Y	C	K	K	Y	G	S
T	F	F	Y	C	K	K	Y	G	I
T	F	F	Y	C	K	K	F	S	S
T	F	F	Y	C	K	K	F	S	I
T	F	F	Y	C	K	K	F	G	S
T	F	F	Y	C	K	N	Y	S	S
T	F	F	Y	C	K	N	Y	S	I
T	F	F	Y	C	K	N	Y	G	S
T	F	F	Y	C	K	N	Y	G	I
T	F	F	Y	C	K	N	F	S	S
T	F	F	Y	C	K	N	F	S	I
T	F	F	Y	C	K	N	F	G	S
T	F	F	Y	C	K	N	F	G	I
T	F	F	Y	C	R	K	Y	S	S
T	F	F	Y	C	R	K	Y	S	I
T	F	F	Y	C	R	K	Y	G	S
T	F	F	Y	C	R	K	Y	G	I
T	F	F	Y	C	R	K	F	S	S
T	F	F	Y	C	R	K	F	S	I
T	F	F	Y	C	R	K	F	G	S
T	F	F	Y	C	R	K	F	G	I
T	F	F	Y	C	R	N	Y	S	S
T	F	F	Y	C	R	N	Y	S	I
T	F	F	Y	C	R	N	Y	G	S
T	F	F	Y	C	R	N	Y	G	I
T	F	F	Y	C	R	N	F	S	S
T	F	F	Y	C	R	N	F	S	I
T	F	F	Y	C	R	N	F	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	F	F	Y	C	R	N	F	G	I
T	F	F	Y	Y	K	K	Y	S	S
T	F	F	Y	Y	K	K	Y	S	I
T	F	F	Y	Y	K	K	Y	G	S
T	F	F	Y	Y	K	K	Y	G	I
T	F	F	Y	Y	K	K	F	S	S
T	F	F	Y	Y	K	K	F	S	I
T	F	F	Y	Y	K	K	F	G	S
T	F	F	Y	Y	K	K	F	G	I
T	F	F	Y	Y	K	N	Y	S	S
T	F	F	Y	Y	K	N	Y	S	I
T	F	F	Y	Y	K	N	Y	G	S
T	F	F	Y	Y	K	N	Y	G	I
T	F	F	Y	Y	K	N	F	S	S
T	F	F	Y	Y	K	N	F	S	I
T	F	F	Y	Y	K	N	F	G	S
T	F	F	Y	Y	K	N	F	G	I
T	F	F	Y	Y	R	K	Y	S	S
T	F	F	Y	Y	R	K	Y	S	I
T	F	F	Y	Y	R	K	Y	G	S
T	F	F	Y	Y	R	K	Y	G	I
T	F	F	Y	Y	R	K	F	S	S
T	F	F	Y	Y	R	K	F	S	I
T	F	F	Y	Y	R	K	F	G	S
T	F	F	Y	Y	R	K	F	G	I
T	F	F	Y	Y	R	N	Y	S	S
T	F	F	Y	Y	R	N	Y	S	I
T	F	F	Y	Y	R	N	Y	G	S
T	F	F	Y	Y	R	N	Y	G	I
T	F	F	Y	Y	R	N	F	S	S
T	F	F	Y	Y	R	N	F	S	I
T	F	F	Y	Y	R	N	F	G	S
T	F	F	Y	Y	R	N	F	G	I
T	F	F	R	C	K	K	Y	S	S
T	F	F	R	C	K	K	Y	S	I
T	F	F	R	C	K	K	Y	G	S
T	F	F	R	C	K	K	Y	G	I
T	F	F	R	C	K	K	F	S	S
T	F	F	R	C	K	K	F	S	I
T	F	F	R	C	K	K	F	G	S
T	F	F	R	C	K	K	F	G	I
T	F	F	R	C	K	N	Y	S	S
T	F	F	R	C	K	N	Y	S	I
T	F	F	R	C	K	N	Y	G	S
T	F	F	R	C	K	N	Y	G	I
T	F	F	R	C	K	N	F	S	S
T	F	F	R	C	K	N	F	S	I
T	F	F	R	C	K	N	F	G	S
T	F	F	R	C	K	N	F	G	I
T	F	F	R	C	R	K	Y	S	S
T	F	F	R	C	R	K	Y	S	I
T	F	F	R	C	R	K	Y	G	S
T	F	F	R	C	R	K	Y	G	I
T	F	F	R	C	R	K	F	S	S
T	F	F	R	C	R	K	F	S	I
T	F	F	R	C	R	K	F	G	S
T	F	F	R	C	R	K	F	G	I
T	F	F	R	C	R	N	Y	S	S
T	F	F	R	C	R	N	Y	S	I
T	F	F	R	C	R	N	Y	G	S
T	F	F	R	C	R	N	Y	G	I
T	F	F	R	C	R	N	F	S	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	F	F	R	C	R	N	F	S	I
T	F	F	R	C	R	N	F	G	S
T	F	F	R	C	R	N	F	G	I
T	F	F	R	Y	K	K	Y	S	S
T	F	F	R	Y	K	K	Y	S	I
T	F	F	R	Y	K	K	Y	G	S
T	F	F	R	Y	K	K	Y	G	I
T	F	F	R	Y	K	K	F	S	S
T	F	F	R	Y	K	K	F	S	I
T	F	F	R	Y	K	K	F	G	S
T	F	F	R	Y	K	K	F	G	I
T	F	F	R	Y	K	N	Y	S	S
T	F	F	R	Y	K	N	Y	S	I
T	F	F	R	Y	K	N	Y	G	S
T	F	F	R	Y	K	N	Y	G	I
T	F	F	R	Y	K	N	F	S	S
T	F	F	R	Y	K	N	F	S	I
T	F	F	R	Y	K	N	F	G	S
T	F	F	R	Y	R	K	Y	S	S
T	F	F	R	Y	R	K	Y	S	I
T	F	F	R	Y	R	K	Y	G	S
T	F	F	R	Y	R	K	Y	G	I
T	F	F	R	Y	R	K	F	S	S
T	F	F	R	Y	R	K	F	S	I
T	F	F	R	Y	R	K	F	G	S
T	F	F	R	Y	R	K	F	G	I
T	F	F	R	Y	R	N	F	S	S
T	F	F	R	Y	R	N	F	S	I
T	F	F	R	Y	R	N	F	G	S
T	F	F	R	Y	R	N	F	G	I
T	F	F	R	Y	R	N	F	S	S
T	F	F	R	Y	R	N	F	S	I
T	F	F	R	Y	R	N	F	G	S
T	F	F	R	Y	R	N	F	G	I
N	V	L	Y	C	K	K	Y	S	S
N	V	L	Y	C	K	K	Y	S	I
N	V	L	Y	C	K	K	Y	G	S
N	V	L	Y	C	K	K	Y	G	I
N	V	L	Y	C	K	K	F	S	S
N	V	L	Y	C	K	K	F	S	I
N	V	L	Y	C	K	K	F	G	S
N	V	L	Y	C	K	K	F	G	I
N	V	L	Y	C	K	N	Y	S	S
N	V	L	Y	C	K	N	Y	S	I
N	V	L	Y	C	K	N	Y	G	S
N	V	L	Y	C	K	N	Y	G	I
N	V	L	Y	C	K	N	Y	S	S
N	V	L	Y	C	K	N	Y	G	S
N	V	L	Y	C	R	K	Y	S	S
N	V	L	Y	C	R	K	Y	S	I
N	V	L	Y	C	R	K	Y	G	S
N	V	L	Y	C	R	K	Y	G	I
N	V	L	Y	C	R	K	F	S	S
N	V	L	Y	C	R	K	F	S	I
N	V	L	Y	C	R	K	F	G	S
N	V	L	Y	C	R	K	F	G	I
N	V	L	Y	C	R	N	Y	S	S
N	V	L	Y	C	R	N	Y	S	I
N	V	L	Y	C	R	N	Y	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	V	L	Y	C	R	N	Y	G	I
N	V	L	Y	C	R	N	F	S	S
N	V	L	Y	C	R	N	F	S	I
N	V	L	Y	C	R	N	F	G	S
N	V	L	Y	C	R	N	F	G	I
N	V	L	Y	Y	K	K	Y	S	S
N	V	L	Y	Y	K	K	Y	S	I
N	V	L	Y	Y	K	K	Y	G	S
N	V	L	Y	Y	K	K	Y	G	I
N	V	L	Y	Y	K	K	F	S	S
N	V	L	Y	Y	K	K	F	S	I
N	V	L	Y	Y	K	K	F	G	S
N	V	L	Y	Y	K	K	F	G	I
N	V	L	Y	Y	K	N	Y	S	S
N	V	L	Y	Y	K	N	Y	S	I
N	V	L	Y	Y	K	N	Y	G	S
N	V	L	Y	Y	K	N	Y	G	I
N	V	L	Y	Y	K	N	F	S	S
N	V	L	Y	Y	K	N	F	S	I
N	V	L	Y	Y	K	N	F	G	S
N	V	L	Y	Y	K	N	F	G	I
N	V	L	Y	Y	R	K	Y	S	S
N	V	L	Y	Y	R	K	Y	S	I
N	V	L	Y	Y	R	K	Y	G	S
N	V	L	Y	Y	R	K	Y	G	I
N	V	L	Y	Y	R	K	F	S	S
N	V	L	Y	Y	R	K	F	S	I
N	V	L	Y	Y	R	K	F	S	G
N	V	L	Y	Y	R	K	F	G	I
N	V	L	Y	Y	R	N	Y	S	S
N	V	L	Y	Y	R	N	Y	S	I
N	V	L	Y	Y	R	N	Y	G	S
N	V	L	Y	Y	R	N	Y	G	I
N	V	L	Y	Y	R	N	F	S	S
N	V	L	Y	Y	R	N	F	S	I
N	V	L	Y	Y	R	N	F	G	S
N	V	L	Y	Y	R	N	F	G	I
N	V	L	Y	Y	R	N	F	S	I
N	V	L	R	C	K	K	Y	S	S
N	V	L	R	C	K	K	Y	S	I
N	V	L	R	C	K	K	Y	G	S
N	V	L	R	C	K	K	Y	G	I
N	V	L	R	C	K	K	F	S	S
N	V	L	R	C	K	K	F	S	I
N	V	L	R	C	K	K	F	G	S
N	V	L	R	C	K	K	F	G	I
N	V	L	R	C	K	N	Y	S	S
N	V	L	R	C	K	N	Y	S	I
N	V	L	R	C	K	N	Y	G	S
N	V	L	R	C	K	N	Y	G	I
N	V	L	R	C	K	N	F	S	S
N	V	L	R	C	K	N	F	S	I
N	V	L	R	C	K	N	F	G	S
N	V	L	R	C	K	N	F	G	I
N	V	L	R	C	R	K	Y	S	S
N	V	L	R	C	R	K	Y	S	I
N	V	L	R	C	R	K	Y	G	S
N	V	L	R	C	R	K	Y	G	I
N	V	L	R	C	R	K	F	S	S
N	V	L	R	C	R	K	F	S	I
N	V	L	R	C	R	K	F	G	S
N	V	L	R	C	R	K	F	G	I
N	V	L	R	C	R	N	Y	S	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	V	L	R	C	R	N	Y	S	I
N	V	L	R	C	R	N	Y	G	S
N	V	L	R	C	R	N	Y	G	I
N	V	L	R	C	R	N	F	S	S
N	V	L	R	C	R	N	F	S	I
N	V	L	R	C	R	N	F	G	S
N	V	L	R	C	R	N	F	G	I
N	V	L	R	Y	K	K	Y	S	S
N	V	L	R	Y	K	K	Y	S	I
N	V	L	R	Y	K	K	Y	G	S
N	V	L	R	Y	K	K	Y	G	I
N	V	L	R	Y	K	K	F	S	S
N	V	L	R	Y	K	K	F	S	I
N	V	L	R	Y	K	K	F	G	S
N	V	L	R	Y	K	K	F	G	I
N	V	L	R	Y	K	N	Y	S	S
N	V	L	R	Y	K	N	Y	S	I
N	V	L	R	Y	K	N	Y	G	S
N	V	L	R	Y	K	N	Y	G	I
N	V	L	R	Y	K	N	F	S	S
N	V	L	R	Y	K	N	F	S	I
N	V	L	R	Y	K	N	F	G	S
N	V	L	R	Y	K	N	F	G	I
N	V	L	R	Y	R	K	Y	S	S
N	V	L	R	Y	R	K	Y	S	I
N	V	L	R	Y	R	K	Y	G	S
N	V	L	R	Y	R	K	Y	G	I
N	V	L	R	Y	R	K	Y	F	S
N	V	L	R	Y	R	K	F	S	S
N	V	L	R	Y	R	K	F	G	S
N	V	L	R	Y	R	K	F	G	I
N	V	L	R	Y	R	N	Y	S	S
N	V	L	R	Y	R	N	Y	S	I
N	V	L	R	Y	R	N	Y	G	S
N	V	L	R	Y	R	N	Y	G	I
N	V	L	R	Y	R	N	F	S	S
N	V	L	R	Y	R	N	F	S	I
N	V	L	R	Y	R	N	F	G	S
N	V	L	R	Y	R	N	F	G	I
N	V	F	Y	C	K	K	Y	S	S
N	V	F	Y	C	K	K	Y	S	I
N	V	F	Y	C	K	K	Y	G	S
N	V	F	Y	C	K	K	Y	G	I
N	V	F	Y	C	K	K	F	S	S
N	V	F	Y	C	K	K	F	S	I
N	V	F	Y	C	K	K	F	G	S
N	V	F	Y	C	K	K	F	G	I
N	V	F	Y	C	K	N	Y	S	S
N	V	F	Y	C	K	N	Y	S	I
N	V	F	Y	C	K	N	Y	G	S
N	V	F	Y	C	K	N	Y	G	I
N	V	F	Y	C	K	N	F	S	S
N	V	F	Y	C	K	N	F	S	I
N	V	F	Y	C	K	N	F	G	S
N	V	F	Y	C	R	K	Y	S	I
N	V	F	Y	C	R	K	Y	S	S
N	V	F	Y	C	R	K	Y	S	I
N	V	F	Y	C	R	K	Y	G	S
N	V	F	Y	C	R	K	Y	G	I
N	V	F	Y	C	R	K	F	S	S
N	V	F	Y	C	R	K	F	S	I
N	V	F	Y	C	R	K	F	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	V	F	Y	C	R	K	F	G	I
N	V	F	Y	C	R	N	Y	S	S
N	V	F	Y	C	R	N	Y	S	I
N	V	F	Y	C	R	N	Y	G	S
N	V	F	Y	C	R	N	Y	G	I
N	V	F	Y	C	R	N	F	S	S
N	V	F	Y	C	R	N	F	S	I
N	V	F	Y	C	R	N	F	G	S
N	V	F	Y	C	R	N	F	G	I
N	V	F	Y	Y	K	K	Y	S	S
N	V	F	Y	Y	K	K	Y	S	I
N	V	F	Y	Y	K	K	Y	G	S
N	V	F	Y	Y	K	K	Y	G	I
N	V	F	Y	Y	K	K	F	S	S
N	V	F	Y	Y	K	K	F	S	I
N	V	F	Y	Y	K	K	F	G	S
N	V	F	Y	Y	K	K	F	G	I
N	V	F	Y	Y	K	N	Y	S	S
N	V	F	Y	Y	K	N	Y	S	I
N	V	F	Y	Y	K	N	Y	G	S
N	V	F	Y	Y	K	N	Y	G	I
N	V	F	Y	Y	K	N	F	S	S
N	V	F	Y	Y	K	N	F	S	I
N	V	F	Y	Y	K	N	F	G	S
N	V	F	Y	Y	K	N	F	G	I
N	V	F	Y	Y	R	K	Y	S	S
N	V	F	Y	Y	R	K	Y	S	I
N	V	F	Y	Y	R	K	Y	G	S
N	V	F	Y	Y	R	K	Y	G	I
N	V	F	Y	Y	R	K	F	S	S
N	V	F	Y	Y	R	K	F	S	I
N	V	F	Y	Y	R	K	F	G	S
N	V	F	Y	Y	R	K	F	G	I
N	V	F	Y	Y	R	N	Y	S	S
N	V	F	Y	Y	R	N	Y	S	I
N	V	F	Y	Y	R	N	Y	G	S
N	V	F	Y	Y	R	N	Y	G	I
N	V	F	Y	Y	R	N	F	S	S
N	V	F	Y	Y	R	N	F	S	I
N	V	F	Y	Y	R	N	F	G	S
N	V	F	Y	Y	R	N	F	G	I
N	V	F	R	C	K	K	Y	S	S
N	V	F	R	C	K	K	Y	S	I
N	V	F	R	C	K	K	Y	G	S
N	V	F	R	C	K	K	Y	G	I
N	V	F	R	C	K	K	F	S	S
N	V	F	R	C	K	K	F	S	I
N	V	F	R	C	K	K	F	G	S
N	V	F	R	C	K	K	F	G	I
N	V	F	R	C	K	N	Y	S	S
N	V	F	R	C	K	N	Y	S	I
N	V	F	R	C	K	N	Y	G	S
N	V	F	R	C	K	N	Y	G	I
N	V	F	R	C	K	N	F	S	S
N	V	F	R	C	K	N	F	S	I
N	V	F	R	C	K	N	F	G	S
N	V	F	R	C	K	N	F	G	I
N	V	F	R	C	R	K	Y	S	S
N	V	F	R	C	R	K	Y	S	I
N	V	F	R	C	R	K	Y	G	S
N	V	F	R	C	R	K	Y	G	I
N	V	F	R	C	R	K	F	S	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	V	F	R	C	R	K	F	S	I
N	V	F	R	C	R	K	F	G	S
N	V	F	R	C	R	K	F	G	I
N	V	F	R	C	R	N	Y	S	S
N	V	F	R	C	R	N	Y	S	I
N	V	F	R	C	R	N	Y	G	S
N	V	F	R	C	R	N	Y	G	I
N	V	F	R	C	R	N	F	S	S
N	V	F	R	C	R	N	F	S	I
N	V	F	R	C	R	N	F	G	S
N	V	F	R	C	R	N	F	G	I
N	V	F	R	Y	K	K	Y	S	S
N	V	F	R	Y	K	K	Y	S	I
N	V	F	R	Y	K	K	Y	G	S
N	V	F	R	Y	K	K	Y	G	I
N	V	F	R	Y	K	K	F	S	S
N	V	F	R	Y	K	K	F	S	I
N	V	F	R	Y	K	K	F	G	S
N	V	F	R	Y	K	K	F	G	I
N	V	F	R	Y	K	N	Y	S	S
N	V	F	R	Y	K	N	Y	S	I
N	V	F	R	Y	K	N	Y	G	S
N	V	F	R	Y	K	N	Y	G	I
N	V	F	R	Y	K	N	F	S	S
N	V	F	R	Y	K	N	F	S	I
N	V	F	R	Y	K	N	F	G	S
N	V	F	R	Y	K	N	F	G	I
N	V	F	R	Y	K	N	F	S	I
N	V	F	R	Y	K	N	F	G	S
N	V	F	R	Y	K	N	F	G	I
N	V	F	R	Y	R	K	Y	S	S
N	V	F	R	Y	R	K	Y	S	I
N	V	F	R	Y	R	K	Y	G	S
N	V	F	R	Y	R	K	Y	G	I
N	V	F	R	Y	R	K	F	S	S
N	V	F	R	Y	R	K	F	S	I
N	V	F	R	Y	R	K	F	G	S
N	V	F	R	Y	R	K	F	G	I
N	V	F	R	Y	R	N	Y	S	S
N	V	F	R	Y	R	N	Y	S	I
N	V	F	R	Y	R	N	Y	G	S
N	V	F	R	Y	R	N	Y	G	I
N	V	F	R	Y	R	N	F	S	S
N	V	F	R	Y	R	N	F	S	I
N	V	F	R	Y	R	N	F	G	S
N	V	F	R	Y	R	N	F	G	I
N	F	L	Y	C	K	K	Y	S	S
N	F	L	Y	C	K	K	Y	S	I
N	F	L	Y	C	K	K	Y	G	S
N	F	L	Y	C	K	K	Y	G	I
N	F	L	Y	C	K	K	F	S	S
N	F	L	Y	C	K	K	F	S	I
N	F	L	Y	C	K	K	F	G	S
N	F	L	Y	C	K	K	F	G	I
N	F	L	Y	C	K	N	Y	S	S
N	F	L	Y	C	K	N	Y	S	I
N	F	L	Y	C	K	N	Y	G	S
N	F	L	Y	C	K	N	Y	G	I
N	F	L	Y	C	K	N	F	S	S
N	F	L	Y	C	K	N	F	S	I
N	F	L	Y	C	K	N	F	G	S
N	F	L	Y	C	K	N	F	G	I
N	F	L	Y	C	R	K	Y	S	S
N	F	L	Y	C	R	K	Y	S	I
N	F	L	Y	C	R	K	Y	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	F	L	Y	C	R	K	Y	G	I
N	F	L	Y	C	R	K	F	S	S
N	F	L	Y	C	R	K	F	S	I
N	F	L	Y	C	R	K	F	G	S
N	F	L	Y	C	R	K	F	G	I
N	F	L	Y	C	R	N	Y	S	S
N	F	L	Y	C	R	N	Y	S	I
N	F	L	Y	C	R	N	Y	G	S
N	F	L	Y	C	R	N	Y	G	I
N	F	L	Y	C	R	N	F	S	S
N	F	L	Y	C	R	N	F	S	I
N	F	L	Y	C	R	N	F	G	S
N	F	L	Y	C	R	N	F	G	I
N	F	L	Y	Y	K	K	Y	S	S
N	F	L	Y	Y	K	K	Y	S	I
N	F	L	Y	Y	K	K	Y	G	S
N	F	L	Y	Y	K	K	Y	G	I
N	F	L	Y	Y	K	K	F	S	S
N	F	L	Y	Y	K	K	F	S	I
N	F	L	Y	Y	K	K	F	G	S
N	F	L	Y	Y	K	K	F	G	I
N	F	L	Y	Y	K	N	Y	S	S
N	F	L	Y	Y	K	N	Y	S	I
N	F	L	Y	Y	K	N	Y	G	S
N	F	L	Y	Y	K	N	Y	G	I
N	F	L	Y	Y	K	N	F	S	S
N	F	L	Y	Y	K	N	F	S	I
N	F	L	Y	Y	K	N	F	S	S
N	F	L	Y	Y	K	N	F	S	I
N	F	L	Y	Y	K	N	F	G	S
N	F	L	Y	Y	R	K	Y	S	S
N	F	L	Y	Y	R	K	Y	S	I
N	F	L	Y	Y	R	K	Y	G	S
N	F	L	Y	Y	R	K	Y	G	I
N	F	L	Y	Y	R	K	F	S	S
N	F	L	Y	Y	R	K	F	S	I
N	F	L	Y	Y	R	K	F	G	S
N	F	L	Y	Y	R	K	F	G	I
N	F	L	Y	Y	R	N	Y	S	S
N	F	L	Y	Y	R	N	Y	S	I
N	F	L	Y	Y	R	N	Y	G	S
N	F	L	Y	Y	R	N	Y	G	I
N	F	L	Y	Y	R	N	F	S	S
N	F	L	Y	Y	R	N	F	S	I
N	F	L	Y	Y	R	N	F	G	S
N	F	L	Y	Y	R	N	F	G	I
N	F	L	R	C	K	K	Y	S	S
N	F	L	R	C	K	K	Y	S	I
N	F	L	R	C	K	K	Y	G	S
N	F	L	R	C	K	K	Y	G	I
N	F	L	R	C	K	K	F	S	S
N	F	L	R	C	K	K	F	S	I
N	F	L	R	C	K	K	F	G	S
N	F	L	R	C	K	K	F	G	I
N	F	L	R	C	K	N	Y	S	S
N	F	L	R	C	K	N	Y	S	I
N	F	L	R	C	K	N	Y	G	S
N	F	L	R	C	K	N	Y	G	I
N	F	L	R	C	K	N	F	S	S
N	F	L	R	C	K	N	F	S	I
N	F	L	R	C	K	N	F	G	S
N	F	L	R	C	K	N	F	G	I
N	F	L	R	C	R	K	Y	S	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	F	L	R	C	R	K	Y	S	I
N	F	L	R	C	R	K	Y	G	S
N	F	L	R	C	R	K	Y	G	I
N	F	L	R	C	R	K	F	S	S
N	F	L	R	C	R	K	F	S	I
N	F	L	R	C	R	K	F	G	S
N	F	L	R	C	R	K	F	G	I
N	F	L	R	C	R	N	Y	S	S
N	F	L	R	C	R	N	Y	S	I
N	F	L	R	C	R	N	Y	G	S
N	F	L	R	C	R	N	Y	G	I
N	F	L	R	C	R	N	F	S	S
N	F	L	R	C	R	N	F	S	I
N	F	L	R	C	R	N	F	G	S
N	F	L	R	C	R	N	F	G	I
N	F	L	R	Y	K	K	Y	S	S
N	F	L	R	Y	K	K	Y	S	I
N	F	L	R	Y	K	K	Y	G	S
N	F	L	R	Y	K	K	Y	G	I
N	F	L	R	Y	K	K	F	S	S
N	F	L	R	Y	K	K	F	S	I
N	F	L	R	Y	K	K	F	G	S
N	F	L	R	Y	K	K	F	G	I
N	F	L	R	Y	K	N	Y	S	S
N	F	L	R	Y	K	N	Y	S	I
N	F	L	R	Y	K	N	Y	G	S
N	F	L	R	Y	K	N	Y	G	I
N	F	L	R	Y	R	K	Y	S	S
N	F	L	R	Y	R	K	Y	S	I
N	F	L	R	Y	R	K	Y	G	S
N	F	L	R	Y	R	K	Y	G	I
N	F	L	R	Y	R	K	F	S	S
N	F	L	R	Y	R	K	F	S	I
N	F	L	R	Y	R	K	F	S	S
N	F	L	R	Y	R	K	F	G	S
N	F	L	R	Y	R	N	Y	S	S
N	F	L	R	Y	R	N	Y	S	I
N	F	L	R	Y	R	N	Y	G	S
N	F	L	R	Y	R	N	Y	G	I
N	F	L	R	Y	R	N	F	S	S
N	F	L	R	Y	R	N	F	S	I
N	F	L	R	Y	R	N	F	G	S
N	F	L	R	Y	R	N	F	G	I
N	F	F	Y	C	K	K	Y	S	S
N	F	F	Y	C	K	K	Y	S	I
N	F	F	Y	C	K	K	Y	G	S
N	F	F	Y	C	K	K	Y	G	I
N	F	F	Y	C	K	K	F	S	S
N	F	F	Y	C	K	K	F	S	I
N	F	F	Y	C	K	K	F	G	S
N	F	F	Y	C	K	K	F	G	I
N	F	F	Y	C	K	N	Y	S	S
N	F	F	Y	C	K	N	Y	S	I
N	F	F	Y	C	K	N	Y	G	S
N	F	F	Y	C	K	N	Y	G	I
N	F	F	Y	C	K	N	F	S	S
N	F	F	Y	C	K	N	F	S	I
N	F	F	Y	C	K	N	F	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
N	F	F	R	C	K	N	F	S	I
N	F	F	R	C	K	N	F	G	S
N	F	F	R	C	K	N	F	G	I
N	F	F	R	C	R	K	Y	S	S
N	F	F	R	C	R	K	Y	S	I
N	F	F	R	C	R	K	Y	G	S
N	F	F	R	C	R	K	Y	G	I
N	F	F	R	C	R	K	F	S	S
N	F	F	R	C	R	K	F	S	I
N	F	F	R	C	R	K	F	G	S
N	F	F	R	C	R	K	F	G	I
N	F	F	R	C	R	N	Y	S	S
N	F	F	R	C	R	N	Y	S	I
N	F	F	R	C	R	N	Y	G	S
N	F	F	R	C	R	N	Y	G	I
N	F	F	R	C	R	N	F	S	S
N	F	F	R	C	R	N	F	S	I
N	F	F	R	C	R	N	F	G	I
N	F	F	R	Y	K	K	Y	S	S
N	F	F	R	Y	K	K	Y	S	I
N	F	F	R	Y	K	K	Y	G	S
N	F	F	R	Y	K	K	Y	G	I
N	F	F	R	Y	K	K	F	S	S
N	F	F	R	Y	K	K	F	S	I
N	F	F	R	Y	K	K	F	G	S
N	F	F	R	Y	K	K	F	G	I
N	F	F	R	Y	K	K	F	S	S
N	F	F	R	Y	K	K	F	G	I
N	F	F	R	Y	K	K	F	S	S
N	F	F	R	Y	K	N	Y	S	S
N	F	F	R	Y	K	N	Y	S	I
N	F	F	R	Y	K	N	Y	G	S
N	F	F	R	Y	K	N	Y	G	I
N	F	F	R	Y	K	N	F	S	S
N	F	F	R	Y	K	N	F	S	I
N	F	F	R	Y	K	N	F	G	S
N	F	F	R	Y	K	N	F	G	I
N	F	F	R	Y	R	K	Y	S	S
N	F	F	R	Y	R	K	Y	S	I
N	F	F	R	Y	R	K	Y	G	S
N	F	F	R	Y	R	K	Y	G	I
N	F	F	R	Y	R	K	F	S	S
N	F	F	R	Y	R	K	F	S	I
N	F	F	R	Y	R	K	F	G	S
N	F	F	R	Y	R	K	F	G	I
N	F	F	R	Y	R	N	Y	S	S
N	F	F	R	Y	R	N	Y	S	I
N	F	F	R	Y	R	N	Y	G	S
N	F	F	R	Y	R	N	Y	G	I
N	F	F	R	Y	R	N	F	S	S
N	F	F	R	Y	R	N	F	S	I
N	F	F	R	Y	R	N	F	G	S
N	F	F	R	Y	R	N	F	G	I
T	V	L	Y	C	K	K	Y	S	S
T	V	L	Y	C	K	K	Y	S	I
T	V	L	Y	C	K	K	Y	G	S
T	V	L	Y	C	K	K	Y	G	I
T	V	L	Y	C	K	K	F	S	S
T	V	L	Y	C	K	K	F	S	I
T	V	L	Y	C	K	K	F	G	S
T	V	L	Y	C	K	K	F	G	I
T	V	L	Y	C	K	N	Y	S	S
T	V	L	Y	C	K	N	Y	S	I
T	V	L	Y	C	K	N	Y	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	V	L	Y	C	K	N	Y	G	I
T	V	L	Y	C	K	N	F	S	S
T	V	L	Y	C	K	N	F	S	I
T	V	L	Y	C	K	N	F	G	S
T	V	L	Y	C	K	N	F	G	I
T	V	L	Y	C	R	K	Y	S	S
T	V	L	Y	C	R	K	Y	S	I
T	V	L	Y	C	R	K	Y	G	S
T	V	L	Y	C	R	K	Y	G	I
T	V	L	Y	C	R	K	F	S	S
T	V	L	Y	C	R	K	F	S	I
T	V	L	Y	C	R	K	F	G	S
T	V	L	Y	C	R	K	F	G	I
T	V	L	Y	C	R	N	Y	S	S
T	V	L	Y	C	R	N	Y	S	I
T	V	L	Y	C	R	N	Y	G	S
T	V	L	Y	C	R	N	Y	G	I
T	V	L	Y	C	R	N	F	S	S
T	V	L	Y	C	R	N	F	S	I
T	V	L	Y	C	R	N	F	G	S
T	V	L	Y	C	R	N	F	G	I
T	V	L	Y	Y	K	K	Y	S	S
T	V	L	Y	Y	K	K	Y	S	I
T	V	L	Y	Y	K	K	Y	G	S
T	V	L	Y	Y	K	K	Y	G	I
T	V	L	Y	Y	K	K	F	S	S
T	V	L	Y	Y	K	K	F	S	I
T	V	L	Y	Y	K	K	F	G	S
T	V	L	Y	Y	K	K	F	G	I
T	V	L	Y	Y	K	N	Y	S	S
T	V	L	Y	Y	K	N	Y	S	I
T	V	L	Y	Y	K	N	Y	G	S
T	V	L	Y	Y	K	N	Y	G	I
T	V	L	Y	Y	K	N	F	S	S
T	V	L	Y	Y	K	N	F	S	I
T	V	L	Y	Y	K	N	F	G	S
T	V	L	Y	Y	K	N	F	G	I
T	V	L	Y	Y	R	K	Y	S	S
T	V	L	Y	Y	R	K	Y	S	I
T	V	L	Y	Y	R	K	Y	G	S
T	V	L	Y	Y	R	K	Y	G	I
T	V	L	Y	Y	R	K	F	S	S
T	V	L	Y	Y	R	K	F	S	I
T	V	L	Y	Y	R	K	F	G	S
T	V	L	Y	Y	R	K	F	G	I
T	V	L	Y	Y	R	K	F	G	S
T	V	L	Y	Y	R	N	Y	S	S
T	V	L	Y	Y	R	N	Y	S	I
T	V	L	Y	Y	R	N	Y	G	S
T	V	L	Y	Y	R	N	Y	G	I
T	V	L	Y	Y	R	N	F	S	S
T	V	L	Y	Y	R	N	F	S	I
T	V	L	Y	Y	R	N	F	G	S
T	V	L	Y	Y	R	N	F	G	I
T	V	L	R	C	K	K	Y	S	S
T	V	L	R	C	K	K	Y	S	I
T	V	L	R	C	K	K	Y	G	S
T	V	L	R	C	K	K	Y	G	I
T	V	L	R	C	K	K	F	S	S
T	V	L	R	C	K	K	F	S	I
T	V	L	R	C	K	K	F	G	S
T	V	L	R	C	K	K	F	G	I
T	V	L	R	C	K	N	Y	S	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	V	L	R	C	K	N	Y	S	I
T	V	L	R	C	K	N	Y	G	S
T	V	L	R	C	K	N	Y	G	I
T	V	L	R	C	K	N	F	S	S
T	V	L	R	C	K	N	F	S	I
T	V	L	R	C	K	N	F	G	S
T	V	L	R	C	K	N	F	G	I
T	V	L	R	C	R	K	Y	S	S
T	V	L	R	C	R	K	Y	S	I
T	V	L	R	C	R	K	Y	G	S
T	V	L	R	C	R	K	Y	G	I
T	V	L	R	C	R	K	F	S	S
T	V	L	R	C	R	K	F	S	I
T	V	L	R	C	R	K	F	G	S
T	V	L	R	C	R	K	F	G	I
T	V	L	R	C	R	N	Y	S	S
T	V	L	R	C	R	N	Y	S	I
T	V	L	R	C	R	N	Y	G	S
T	V	L	R	C	R	N	Y	G	I
T	V	L	R	C	R	N	F	S	S
T	V	L	R	C	R	N	F	S	I
T	V	L	R	C	R	N	F	G	S
T	V	L	R	C	R	N	F	G	I
T	V	L	R	Y	K	K	Y	S	S
T	V	L	R	Y	K	K	Y	S	I
T	V	L	R	Y	K	K	Y	G	S
T	V	L	R	Y	K	K	Y	G	I
T	V	L	R	Y	K	K	F	S	S
T	V	L	R	Y	K	K	F	S	I
T	V	L	R	Y	K	K	F	G	S
T	V	L	R	Y	K	K	F	G	I
T	V	L	R	Y	K	N	Y	S	S
T	V	L	R	Y	K	N	Y	S	I
T	V	L	R	Y	K	N	Y	G	S
T	V	L	R	Y	K	N	Y	G	I
T	V	L	R	Y	K	N	F	S	S
T	V	L	R	Y	K	N	F	S	I
T	V	L	R	Y	K	N	F	S	G
T	V	L	R	Y	R	K	Y	S	S
T	V	L	R	Y	R	K	Y	S	I
T	V	L	R	Y	R	K	Y	G	S
T	V	L	R	Y	R	K	Y	G	I
T	V	L	R	Y	R	K	F	S	S
T	V	L	R	Y	R	K	F	S	I
T	V	L	R	Y	R	K	F	G	S
T	V	L	R	Y	R	K	F	G	I
T	V	L	R	Y	R	K	F	S	S
T	V	L	R	Y	R	K	F	S	I
T	V	L	R	Y	R	K	F	G	S
T	V	L	R	Y	R	K	F	G	I
T	V	F	Y	C	K	K	Y	S	S
T	V	F	Y	C	K	K	Y	S	I
T	V	F	Y	C	K	K	Y	G	S
T	V	F	Y	C	K	K	Y	G	I
T	V	F	Y	C	K	K	F	S	S
T	V	F	Y	C	K	K	F	S	I
T	V	F	Y	C	K	K	F	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	V	F	Y	C	K	K	F	G	I
T	V	F	Y	C	K	N	Y	S	S
T	V	F	Y	C	K	N	Y	S	I
T	V	F	Y	C	K	N	Y	G	S
T	V	F	Y	C	K	N	Y	G	I
T	V	F	Y	C	K	N	F	S	S
T	V	F	Y	C	K	N	F	S	I
T	V	F	Y	C	K	N	F	G	S
T	V	F	Y	C	K	N	F	G	I
T	V	F	Y	C	R	K	Y	S	S
T	V	F	Y	C	R	K	Y	S	I
T	V	F	Y	C	R	K	Y	G	S
T	V	F	Y	C	R	K	Y	G	I
T	V	F	Y	C	R	K	F	S	S
T	V	F	Y	C	R	K	F	S	I
T	V	F	Y	C	R	K	F	G	S
T	V	F	Y	C	R	K	F	G	I
T	V	F	Y	C	R	N	Y	S	S
T	V	F	Y	C	R	N	Y	S	I
T	V	F	Y	C	R	N	Y	G	S
T	V	F	Y	C	R	N	Y	G	I
T	V	F	Y	C	R	N	F	S	S
T	V	F	Y	C	R	N	F	S	I
T	V	F	Y	C	R	N	F	G	S
T	V	F	Y	C	R	N	F	G	I
T	V	F	Y	Y	K	K	Y	S	S
T	V	F	Y	Y	K	K	Y	S	I
T	V	F	Y	Y	K	K	Y	G	S
T	V	F	Y	Y	K	K	Y	G	I
T	V	F	Y	Y	K	K	F	S	S
T	V	F	Y	Y	K	K	F	S	I
T	V	F	Y	Y	K	K	F	G	S
T	V	F	Y	Y	K	K	F	G	I
T	V	F	Y	Y	K	N	Y	S	S
T	V	F	Y	Y	K	N	Y	S	I
T	V	F	Y	Y	K	N	Y	G	S
T	V	F	Y	Y	K	N	Y	G	I
T	V	F	Y	Y	K	N	Y	G	S
T	V	F	Y	Y	K	N	F	S	S
T	V	F	Y	Y	K	N	F	S	I
T	V	F	Y	Y	K	N	F	G	S
T	V	F	Y	Y	K	N	F	G	I
T	V	F	Y	Y	R	K	Y	S	S
T	V	F	Y	Y	R	K	Y	S	I
T	V	F	Y	Y	R	K	Y	G	S
T	V	F	Y	Y	R	K	Y	G	I
T	V	F	Y	Y	R	K	F	S	S
T	V	F	Y	Y	R	K	F	S	I
T	V	F	Y	Y	R	K	F	G	S
T	V	F	Y	Y	R	K	F	G	I
T	V	F	Y	Y	R	N	Y	S	S
T	V	F	Y	Y	R	N	Y	S	I
T	V	F	Y	Y	R	N	Y	G	S
T	V	F	Y	Y	R	N	Y	G	I
T	V	F	Y	Y	R	N	F	S	S
T	V	F	Y	Y	R	N	F	S	I
T	V	F	Y	Y	R	N	F	G	S
T	V	F	Y	Y	R	N	F	G	I
T	V	F	R	C	K	K	Y	S	S
T	V	F	R	C	K	K	Y	S	I
T	V	F	R	C	K	K	Y	G	S
T	V	F	R	C	K	K	Y	G	I
T	V	F	R	C	K	K	F	S	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	F	L	Y	C	K	K	Y	G	I
T	F	L	Y	C	K	K	F	S	S
T	F	L	Y	C	K	K	F	S	I
T	F	L	Y	C	K	K	F	G	S
T	F	L	Y	C	K	K	F	G	I
T	F	L	Y	C	K	N	Y	S	S
T	F	L	Y	C	K	N	Y	S	I
T	F	L	Y	C	K	N	Y	G	S
T	F	L	Y	C	K	N	Y	G	I
T	F	L	Y	C	K	N	F	S	S
T	F	L	Y	C	K	N	F	S	I
T	F	L	Y	C	K	N	F	G	S
T	F	L	Y	C	K	N	F	G	I
T	F	L	Y	C	R	K	Y	S	S
T	F	L	Y	C	R	K	Y	S	I
T	F	L	Y	C	R	K	Y	G	S
T	F	L	Y	C	R	K	Y	G	I
T	F	L	Y	C	R	K	F	S	S
T	F	L	Y	C	R	K	F	S	I
T	F	L	Y	C	R	K	F	G	S
T	F	L	Y	C	R	K	F	G	I
T	F	L	Y	C	R	N	Y	S	S
T	F	L	Y	C	R	N	Y	S	I
T	F	L	Y	C	R	N	Y	G	S
T	F	L	Y	C	R	N	Y	G	I
T	F	L	Y	C	R	N	F	S	S
T	F	L	Y	C	R	N	F	S	I
T	F	L	Y	C	R	N	F	G	S
T	F	L	Y	C	R	N	F	G	I
T	F	L	Y	Y	K	K	Y	S	S
T	F	L	Y	Y	K	K	Y	S	I
T	F	L	Y	Y	K	K	Y	G	S
T	F	L	Y	Y	K	K	Y	G	I
T	F	L	Y	Y	K	K	F	S	S
T	F	L	Y	Y	K	K	F	S	I
T	F	L	Y	Y	K	K	F	G	S
T	F	L	Y	Y	K	K	F	G	I
T	F	L	Y	Y	K	K	F	G	S
T	F	L	Y	Y	K	N	Y	S	S
T	F	L	Y	Y	K	N	Y	S	I
T	F	L	Y	Y	K	N	Y	G	S
T	F	L	Y	Y	K	N	Y	G	I
T	F	L	Y	Y	K	N	F	S	S
T	F	L	Y	Y	K	N	F	S	I
T	F	L	Y	Y	K	N	F	G	S
T	F	L	Y	Y	K	N	F	G	I
T	F	L	Y	Y	R	K	Y	S	S
T	F	L	Y	Y	R	K	Y	S	I
T	F	L	Y	Y	R	K	Y	G	S
T	F	L	Y	Y	R	K	Y	G	I
T	F	L	Y	Y	R	K	F	S	S
T	F	L	Y	Y	R	K	F	S	I
T	F	L	Y	Y	R	K	F	G	S
T	F	L	Y	Y	R	K	F	G	I
T	F	L	Y	Y	R	N	Y	S	S
T	F	L	Y	Y	R	N	Y	S	I
T	F	L	Y	Y	R	N	Y	G	S
T	F	L	Y	Y	R	N	Y	G	I
T	F	L	Y	Y	R	N	F	S	S
T	F	L	Y	Y	R	N	F	S	I
T	F	L	Y	Y	R	N	F	G	S
T	F	L	Y	Y	R	N	F	G	I
T	F	L	R	C	K	K	Y	S	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	F	L	R	C	K	K	Y	S	I
T	F	L	R	C	K	K	Y	G	S
T	F	L	R	C	K	K	Y	G	I
T	F	L	R	C	K	K	F	S	S
T	F	L	R	C	K	K	F	S	I
T	F	L	R	C	K	K	F	G	S
T	F	L	R	C	K	K	F	G	I
T	F	L	R	C	K	N	Y	S	S
T	F	L	R	C	K	N	Y	S	I
T	F	L	R	C	K	N	Y	G	S
T	F	L	R	C	K	N	Y	G	I
T	F	L	R	C	K	N	F	S	S
T	F	L	R	C	K	N	F	S	I
T	F	L	R	C	K	N	F	G	S
T	F	L	R	C	K	N	F	G	I
T	F	L	R	C	R	K	Y	S	S
T	F	L	R	C	R	K	Y	S	I
T	F	L	R	C	R	K	Y	G	S
T	F	L	R	C	R	K	Y	G	I
T	F	L	R	C	R	K	F	S	S
T	F	L	R	C	R	K	F	S	I
T	F	L	R	C	R	K	F	G	S
T	F	L	R	C	R	K	F	G	I
T	F	L	R	C	R	N	Y	S	S
T	F	L	R	C	R	N	Y	S	I
T	F	L	R	C	R	N	Y	G	S
T	F	L	R	C	R	N	Y	G	I
T	F	L	R	C	R	N	Y	G	S
T	F	L	R	C	R	N	F	S	S
T	F	L	R	C	R	N	F	S	I
T	F	L	R	C	R	N	F	G	S
T	F	L	R	C	R	N	F	G	I
T	F	L	R	Y	K	K	Y	S	S
T	F	L	R	Y	K	K	Y	S	I
T	F	L	R	Y	K	K	Y	G	S
T	F	L	R	Y	K	K	Y	G	I
T	F	L	R	Y	K	K	F	S	S
T	F	L	R	Y	K	K	F	S	I
T	F	L	R	Y	K	K	F	G	S
T	F	L	R	Y	K	K	F	G	I
T	F	L	R	Y	K	N	Y	S	S
T	F	L	R	Y	K	N	Y	S	I
T	F	L	R	Y	K	N	Y	G	S
T	F	L	R	Y	K	N	Y	G	I
T	F	L	R	Y	K	N	F	S	S
T	F	L	R	Y	K	N	F	S	I
T	F	L	R	Y	K	N	F	G	S
T	F	L	R	Y	K	N	F	G	I
T	F	L	R	Y	K	N	F	G	S
T	F	L	R	Y	R	K	Y	S	S
T	F	L	R	Y	R	K	Y	S	I
T	F	L	R	Y	R	K	Y	G	S
T	F	L	R	Y	R	K	Y	G	I
T	F	L	R	Y	R	K	F	S	S
T	F	L	R	Y	R	K	F	S	I
T	F	L	R	Y	R	K	F	G	S
T	F	L	R	Y	R	K	F	G	I
T	F	L	R	Y	R	N	Y	S	S
T	F	L	R	Y	R	N	Y	S	I
T	F	L	R	Y	R	N	Y	G	S
T	F	L	R	Y	R	N	Y	G	I
T	F	L	R	Y	R	N	F	S	S
T	F	L	R	Y	R	N	F	S	I
T	F	L	R	Y	R	N	F	G	S

ES 2 661 952 T3

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	F	L	R	Y	R	N	F	G	I
T	F	F	Y	C	K	K	Y	S	S
T	F	F	Y	C	K	K	Y	S	I
T	F	F	Y	C	K	K	Y	G	S
T	F	F	Y	C	K	K	Y	G	I
T	F	F	Y	C	K	K	F	S	S
T	F	F	Y	C	K	K	F	S	I
T	F	F	Y	C	K	K	F	G	S
T	F	F	Y	C	K	K	F	G	I
T	F	F	Y	C	K	N	Y	S	S
T	F	F	Y	C	K	N	Y	S	I
T	F	F	Y	C	K	N	Y	G	S
T	F	F	Y	C	K	N	Y	G	I
T	F	F	Y	C	K	N	F	S	S
T	F	F	Y	C	K	N	F	S	I
T	F	F	Y	C	K	N	F	G	S
T	F	F	Y	C	K	N	F	G	I
T	F	F	Y	C	R	K	Y	S	S
T	F	F	Y	C	R	K	Y	S	I
T	F	F	Y	C	R	K	Y	G	S
T	F	F	Y	C	R	K	Y	G	I
T	F	F	Y	C	R	K	F	S	S
T	F	F	Y	C	R	K	F	S	I
T	F	F	Y	C	R	K	F	G	S
T	F	F	Y	C	R	K	F	G	I
T	F	F	Y	C	R	N	Y	S	S
T	F	F	Y	C	R	N	Y	S	I
T	F	F	Y	C	R	N	Y	S	S
T	F	F	Y	C	R	N	F	S	S
T	F	F	Y	C	R	N	F	S	I
T	F	F	Y	C	R	N	F	G	S
T	F	F	Y	C	R	N	F	G	I
T	F	F	Y	Y	K	K	Y	S	S
T	F	F	Y	Y	K	K	Y	S	I
T	F	F	Y	Y	K	K	Y	G	S
T	F	F	Y	Y	K	K	Y	G	I
T	F	F	Y	Y	K	K	Y	S	S
T	F	F	Y	Y	K	K	Y	S	I
T	F	F	Y	Y	K	K	F	S	S
T	F	F	Y	Y	K	K	F	G	S
T	F	F	Y	Y	K	K	F	G	I
T	F	F	Y	Y	K	N	Y	S	S
T	F	F	Y	Y	K	N	Y	S	I
T	F	F	Y	Y	K	N	Y	G	S
T	F	F	Y	Y	K	N	Y	G	I
T	F	F	Y	Y	K	N	F	S	S
T	F	F	Y	Y	K	N	F	S	I
T	F	F	Y	Y	K	N	F	G	S
T	F	F	Y	Y	K	N	F	G	I
T	F	F	Y	Y	R	K	Y	S	S
T	F	F	Y	Y	R	K	Y	S	I
T	F	F	Y	Y	R	K	Y	G	S
T	F	F	Y	Y	R	K	Y	G	I
T	F	F	Y	Y	R	K	F	S	S
T	F	F	Y	Y	R	K	F	S	I
T	F	F	Y	Y	R	K	F	G	S
T	F	F	Y	Y	R	K	F	G	I
T	F	F	Y	Y	R	N	Y	S	S
T	F	F	Y	Y	R	N	Y	S	I
T	F	F	Y	Y	R	N	Y	G	S
T	F	F	Y	Y	R	N	Y	G	I
T	F	F	Y	Y	R	N	F	S	S

22	30	31	32	38	45	51	98	99	100
T	F	F	R	Y	R	N	Y	G	I
T	F	F	R	Y	R	N	F	S	S
T	F	F	R	Y	R	N	F	S	I
T	F	F	R	Y	R	N	F	G	S
T	F	F	R	Y	R	N	F	G	I

EJEMPLO 9

INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE ERBB2 INDUCIDA POR HEREGULINA-β Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÉLULAS MCF7 QUE EXPRESAN ERBB2 BAJO

5 Como se describen en el Ejemplo 4, los sobrenadantes de hibridoma podrían inhibir la fosforilación de ErbB2 inducida por heregulina en células MCF7. Usando anticuerpos monoclonales purificados, se determinó la potencia de los anticuerpos contra ErbB2, también en comparación con dos anticuerpos inhibidores 2C4 y Herceptin®. Brevemente, se sembraron células MCF7 a 20.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se cultivaron en medio de crecimiento completo (10 % de FCS) durante la noche. Al día siguiente, las placas de cultivo celular se lavaron una vez con PBS y el medio de cultivo se sustituyó con medio libre de rojo de fenol y sin suero. Las células se privaron de suero durante la noche, y entonces se incubaron con mAbs, Herceptin®, 2C4 valorando 1:5 de 10 µg/ml en medio sin suero durante 1 hora antes tratar con heregulina-β 10 nM durante 10 minutos. Se prepararon lisados celulares como se describe en el Ejemplo 4 y se midió el nivel de fósforo-ErbB2 usando un kit de ELISA de R&D Systems (human Phospho-ErbB2 DuoSet IC, Cat N.º DYC1768), según el protocolo proporcionado. El porcentaje de inhibición se calculó basándose en el nivel de pErbB2 en células no estimuladas y células estimuladas con heregulina en ausencia de anticuerpos. Se representó una curva de respuesta a dosis para cada anticuerpo usando el software PrismGraphpad.

20 La Figura 3 ilustra las curvas de respuesta a dosis de un experimento representativo. Se derivaron valores de CE₅₀ de análisis de regresión no lineal, y se mostraron en la Tabla 7. 2C4 inhibió la fosforilación de ErbB2 mientras que Herceptin® tuvo poco efecto. Ocho de los 11 anticuerpos monoclonales probados mostraron actividad inhibitoria en la fosforilación de ErbB2 en células MCF7. Pareció que 1.18.1 tenía mejor potencia que 2C4.

25 **Tabla 7. Potencia de 10 mAb purificados en la inhibición de la fosforilación de ErbB2 inducida por heregulina en células MCF7.**

mAbs	CE ₅₀ (ng/ml) n1	CE50 (ng/ml) n2
2C4	43,6	14,6
Herceptin®	>10.000	>10.000
1.18.1	4,2	10,8
1.20.1	15,5	17,4
1.140.1	14,65	22,9
1.96.2	28,8	34
1.100.1	39,9	33,7
1.14.1	33,7	22,9
1.39.1	46,9	26,3
1.24.3	42,9	20,4
1.43.1	>10.000	>10.000
1.44.1	>10.000	>10.000
1.71.3	>10.000	nd

30 También se examinó el efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la proliferación celular inducida por heregulina. Se sembraron células MCF7 a 6000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio DMEM libre de rojo de fenol con 10 % de FCS, piruvato de Na, L-glutamina, y se dejó que crecieran durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, las células se lavaron una vez con PBS frío y el medio de cultivo se sustituyó con 100 µl de medio libre de FCS/rojo de fenol más piruvato de Na y se incubó durante 4 horas a 37 °C. Entonces, se eliminó el medio libre de FCS y se añadieron 50 µl de mAbs valorados y 50 µl de heregulina-β 2 nM a las células. Después de incubar las células con anticuerpos y heregulina durante tres días a 37 °C, se añadieron 25 µl de reactivo luminiscente CellTiter-Glo (Promega, catálogo N.º G7570) a cada pocillo. Las placas se agitaron durante 5 minutos y luego se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La luminiscencia se leyó en un luminómetro de placas de microtítulo (Tecan GENios Pro). El porcentaje de inhibición se calculó basándose en el nivel de luminiscencia en células no estimuladas y células estimuladas con heregulina en ausencia de anticuerpos.

40 Como se muestra en la Figura 4, se representó una curva de respuesta a dosis para cada anticuerpo usando el software PrismGraphpad. Los valores de CE₅₀ se derivaron de análisis de regresión no lineal, y se enumeran en la Tabla 8. Como se presenta en el ensayo de fosforilación de ErbB2, 2C4 y los mismos 8 anticuerpos que fueron eficaces en inhibir la fosforilación de ErbB2 mostraron inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de

células MCF7 inducida por heregulina, pero no Herceptin® y los 3 anticuerpos ineficaces en bloquear la fosforilación de ErbB2.

5 Tabla 8. Potencia y eficacia de 10 mAbs purificados en inhibir la proliferación de células MCF7 inducida por heregulina

mAbs	CE ₅₀ (ng/ml)	% de inhibición a 10 µg/ml
2C4	404,5	90
Herceptin®	>10.000	39
1.18.1	414,8	94
1.20.1	770,1	100
1.140.1	633,3	91
1.96.2	2832	98
1.100.1	2043	95
1.14.1	640	96
1.39.1	479,3	89
1.24.3	3017	81
1.43.1	~10.000	53
1.44.1	>10.000	18
1.71.3	>10.000	nd

EJEMPLO 10

INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS BT474 Y SKBR3

10 También se examinaron los 8 anticuerpos neutralizantes eficaces en células que expresan ErbB2 baja (MCF7) para su capacidad para inhibir células que expresan ErbB2 alta en un ensayo de proliferación celular de 4 días. Se sembraron cinco mil células (BT474 o SKBR3) en 50 µl de medio de crecimiento con 10 % de FCS en placas de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C durante 4 horas con el fin de unirse a las placas. Se valoraron anticuerpos monoclonales 1:5 en medio de crecimiento a 2X concentraciones finales a partir de 40 µg/ml. Se añadieron cincuenta (50) µl de 2C4, Herceptin® y 8 mAbs anti-ErbB2 a las placas y las células se cultivaron con anticuerpos durante 4 días. Se añadieron veinticinco (25) µl de reactivo CellTiter-glo a cada pocillo. Las placas se agitaron durante 5 minutos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La luminiscencia se leyó en un luminómetro de placas de microtítulo (Tecan GENios Pro). El porcentaje de inhibición se calculó basándose en el nivel de la señal de luminiscencia en el día 4 y día 0 en ausencia de anticuerpos. Se representó una curva de respuesta a dosis para cada anticuerpo usando el software PrismGraphpad, y los valores de CE₅₀ se derivaron de análisis de regresión no lineal.

25 Las Figuras 5 y 6 ilustran datos de un experimento representativo. Se enumeran tanto CE₅₀ como el máximo porcentaje de inhibición en la Tabla 9 y 10. Como se informa, Herceptin® mostró inhibición dependiente de la dosis de tanto la proliferación de células BT474 como SKBR3 mientras que 2C4 tuvo poco efecto. Todos los anticuerpos monoclonales demostraron inhibición dependiente de la dosis presentada de la proliferación de células BT474 y SKBR3 con potencia comparable a Herceptin®.

30 Tabla 9. Potencia y eficacia de 8 anticuerpos en inhibir la proliferación de células BT474

Abs	N1 EC50 (ng/ml)	N1 % de inhibición a 40 µg/ml	N2 CE ₅₀ (ng/ml)	N2 % de inhibición a 40 µg/ml
Herceptin®	144,8	61	81,8	57
2C4	>40.000	-9	4750,0	18
hlgG1	>40.000	-2	>40.000	10
1.96.2	131,3	35	66,3	29
1.20.1	85,3	40	12,8	37
1.140.1	299,8	39	70,9	45
1.18.1	38,1	34	28,2	39
1.100.1	169,4	35	91,1	32
1.24.3	198,3	24	74,4	29
1.14.1	135,7	38	63,0	39
1.39.1	156,4	29	42,3	40

Tabla 10. Potencia y eficacia de 8 anticuerpos en inhibir la proliferación de células SKBR3

Abs	CE ₅₀ (ng/ml)	% de inhibición a 36 µg/ml
Herceptin®	54,5	59
2C4	>36.000	18
hlgG1	>36.000	2
1.96.2	41,7	43
1.20.1	25,2	49
1.140.1	42,7	44
1.18.1	26,3	46
1.100.1	61,3	54
1.24.3	48,5	37
1.14.1	35,7	52
1.39.1	68,9	41

EJEMPLO 11

5 INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE ERBB2 EN CÉLULAS BT474

Para identificar el mecanismo de acción de estos anticuerpos en líneas celulares que expresan ErbB2 alta, se probó el anticuerpo 1.18.1 para el efecto sobre la fosforilación de ErbB2 constitutiva en células BT474 junto con Herceptin® y 2C4. Se sembraron células BT474 en placas de cultivo de 96 pocillos en medio de cultivo completo a 5000 células/pocillo en el día 1, 10000 células/pocillo en el día 2 y día 3, o a 20000 células/pocillo en el día 4. Las células se incubaron a 37 °C durante 3-4 horas y se dejó que se unieran a las placas. Se valoraron anticuerpos monoclonales 1:5 en medio completo a partir de 10 µg/ml para 6 puntos y luego se añadieron a células. Las células se incubaron con anticuerpos monoclonales durante 1-4 días. En el día 5, las células se lisaron en tampón complementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa como se ha descrito previamente. Se determinaron los niveles de fósforo-ErbB2 en lisados celulares por ELISA. La proliferación celular se midió por CyQuant (Invitrogen). El porcentaje de inhibición se calculó según el nivel de pErB2 en ausencia de anticuerpos. También se calcularon fósforo-ErbB2/célula normalizando los niveles de fósforo-ErbB2 a números de células. Se representó una curva de respuesta a dosis para cada anticuerpo usando el software PrismGraphpad, y los valores de CE₅₀ se derivaron de análisis de regresión no lineal.

Las Figuras 7 y 8 ilustran la respuesta a dosis en diferentes momentos de tiempo. Tanto CE₅₀ como el máximo porcentaje de inhibición se enumeraron en la Tabla 11. El Ab monoclonal 1.18.1 empezó a mostrar inhibición de pErB2 a las 48 h y alcanzó la máxima inhibición a las 72 horas. Sin embargo, Herceptin® no mostró un efecto significativo hasta las 72 h, mientras que 2C4 tuvo poco efecto. De forma interesante, cuando los niveles de fósforo-ErbB2 se normalizaron por el número de células, la inhibición de la fosforilación de ErbB2 por 1.18.1 alcanzó el máximo a las 48 horas; mientras que no pareció que Herceptin® inhibiera la fosforilación de ErbB2, como se ha publicado previamente.

A continuación, se investigó el efecto de 7 de los anticuerpos sobre la fosforilación de ErbB2 constitutiva en células BT474 después de 48 horas. Brevemente, se sembraron 10.000 células BT474 en 50 µl de medio de cultivo completo en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante 3-4 horas a 37 °C para unirse a las placas. Entonces se añadieron 50 µl de 20 µg/ml de 2C4, Herceptin® y anticuerpos monoclonales anti-ErbB2, preparados a 2X concentraciones finales en medio de cultivo completo, a las placas y se incubaron con células durante 48 horas. Se prepararon lisados celulares y los niveles de fósforo-ErbB2 se midieron por ELISA, como se describe en el Ejemplo 4. El porcentaje de inhibición se calculó según el nivel de pErB2 en ausencia de anticuerpos. Como se enumera en la Tabla 11, los 7 mAbs presentaron inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de ErbB2 en células BT474 a las 48 horas. En comparación, Herceptin® y 2C4 tuvieron poco efecto.

Tabla 11. Potencia de 7 anticuerpos en inhibir la fosforilación de ErbB2 en célula BT474 a las 48 horas

Abs	% de inhibición a 10 µg/ml (n1)	% de inhibición a 10 µg/ml (n2)
Herceptin®	5	10
2C4	10	7
1.96.2	37	30
1.20.1	21	28
1.140.1	31	33
1.18.1	24	33
1.100.1	37	26
1.14.1	37	45
1.39.1	37	26

40

EJEMPLO 12DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD POR ANTICUERPOS ANTI-ERBB2 USANDO (A) ANÁLISIS BIACORE DE RESOLUCIÓN DE MEDIO

5 Se midió la afinidad de unión de ocho de los anticuerpos anti-ErbB2 por Biacore de resolución en medio. Todos los experimentos se realizaron usando un instrumento Biacore 2000.

10 Primero, se prepararon 12 superficies de anticuerpo α -IgG humana de cabra de alta densidad sobre tres chips CM5 Biacore usando acoplamiento de amina rutinario. Entonces, se diluyeron mAbs en tampón de electroforesis HBS-P que contenía 100 μ g/ml de albúmina de suero bovino (BSA), específicamente el mAb 1.18.1 a 11 μ g/ml, mAb 1.20.1 a 9,9 μ g/ml, mAb 1.100.1 a 11 μ g/ml, mAb 1.96.2 a 9,3 μ g/ml, mAb 1.140.1 a 9,2 μ g/ml, mAb 1.14.1 a 9,3 μ g/ml, mAb 1.39.1 a 10 μ g/ml y mAb 1.24.3 a 10 μ g/ml. Antes del ciclo de inyección de antígeno, cada mAb se capturó durante seis a nueve segundos a un caudal de 100 μ l/min. Una etapa de lavado de 2 minutos siguió a cada inyección de captura para estabilizar cada nivel inicial de mAb. Se inyectó (ECD de) ErbB2 humana purificada-cMyc/His durante 90 segundos a un intervalo de concentración de 307 - 4,80 nM (2x dilución sucesiva) para todos los mAbs, seguido de una disociación de 15 minutos, excepto para los mAbs 1.39.1 y 1.24.3 donde la disociación se siguió durante 20 min. Todas las muestras se inyectaron al azar con varios ciclos de inyección de captura de mAb/tampón intercalados para referencia doble. Se generaron las superficies anticuerpo α -humano de cabra de alta densidad con un pulso de 12 segundos de ácido fosfórico 146 mM (pH 1,5) después de cada ciclo. Se usó un caudal de 100 μ l/min para todos los ciclos de inyección. Los datos se ajustaron a un modelo de interacción 1:1 usando CLAMP. Las constantes de unión resultantes se enumeran en la tabla a continuación. Los mAbs se enumeran en el orden de la mayor a la menor afinidad.

25 Tabla 12(a). Afinidades de unión de 8 anticuerpos contra ErbB2 humana por análisis Biacore de resolución en medio

mAbs	R _{máx}	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	K _D (nM)
1.39.1	57	1,15 X 10 ⁵	2,36 X 10 ⁻⁴	2,0
1.14.1	70	1,02 X 10 ⁵	2,56 X 10 ⁻⁴	2,5
1.96.2	51	1,03 X 10 ⁵	2,73 X 10 ⁻⁴	2,6
1.100.1	100	1,04 X 10 ⁵	3,01 X 10 ⁻⁴	2,9
1.18.1	157	1,00 X 10 ⁵	3,02 X 10 ⁻⁴	3,0
1.140.1	66	0,94 X 10 ⁵	3,33 X 10 ⁻⁴	3,5
1.20.1	56	0,95 X 10 ⁵	3,44 X 10 ⁻⁴	3,6
1.24.3	65	1,28 X 10 ⁵	6,55 X 10 ⁻⁴	5,1

(B) ANÁLISIS BIACORE DE RESOLUCIÓN ALTA

30 Todos los experimentos se realizaron usando un instrumento Biacore T100. Primero, se preparó una superficie de anticuerpo α -IgG humana de alta densidad (Caltag H10500) sobre dos chips CM5 Biacore usando acoplamiento de amina rutinario. Cada mAb se diluyó en tampón de electroforesis HBS-P que contenía 100 μ g/ml de albúmina de suero bovino (BSA). El mAb 1.140 se diluyó a 5 μ g/ml, mAb 1.96.2 a 5,9 μ g/ml, mAb 1.39.1 a 8,7 μ g/ml, mAb 2C4 a 2 μ g/ml y herceptin a 4 μ g/ml.

35 Se desarrolló un protocolo de nivel de captura para los cinco mAbs. Antes de cada ciclo de inyección de antígeno, cada mAb se capturó durante 15 a 30 segundos a un caudal de 20 μ l/min. Una etapa de lavado de 5 minutos siguió a cada inyección de captura para estabilizar cada nivel inicial de mAb. Se inyectó el antígeno hHer-2(ECD)cMyc (Lote N.º 452) durante 4 minutos a un intervalo de concentración de 369 - 5,76 nM (2x dilución sucesiva) para los mAbs 1.140, 1.96.2 y 1.39.1, seguido de una disociación de 15 minutos, y un intervalo de concentración de 650 - 10,2 nM (2x dilución sucesiva) para el mAb 2C4 y herceptin seguido de una disociación de 25 minutos. Las muestras se prepararon en el tampón de electroforesis descrito anteriormente. Todas las muestras se inyectaron al azar con varios ciclos de inyección de captura de mAb/tampón intercalados para referencia doble. Se generaron las superficies de anticuerpo α -humano de cabra de alta densidad con un pulso de 15 segundos de ácido fosfórico 146 mM (pH 1,5) después de cada ciclo. Se usó un caudal de 50 μ l/min para todos los ciclos de inyección.

45 Todos los datos del sensograma se ajustaron a un modelo de interacción 1:1 usando CLAMP. Las constantes de unión resultantes se enumeran en la tabla a continuación. Los mAbs se enumeran en el orden de la mayor a la menor afinidad.

50 Tabla 12(b). Afinidades de unión de 3 anticuerpos contra ErbB2 humana por análisis Biacore de resolución alta

Muestra	R _{máx}	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	K _D (nM)
2C4	105, 88	1,21 X 10 ⁴	3,91 X 10 ⁻⁵	3,2
Herceptin	60	2,34 X 10 ⁴	9,80 X 10 ⁻⁵	4,2
1.140	110	1,64 X 10 ⁴	1,73 X 10 ⁻⁴	10,6
1.96.2	93	1,68 X 10 ⁴	1,94 X 10 ⁻⁴	11,6
1.39.1	120	1,60 X 10 ⁴	2,14 X 10 ⁻⁴	13,4

EJEMPLO 13AGRUPAMIENTO POR COMPETICIÓN DE ANTICUERPOS

- 5 2C4 se une supuestamente al dominio de dimerización sobre ErbB2, mientras que Herceptin® se une al dominio del extremo C en la región extracelular de ErbB2 (véase Franklin et al., Cancer Cell. 2004 Apr;5(4):317-28 y Cho et al., Nature. 2003 Feb 13;421(6924):756-60). Para determinar si los epítopos de unión de 8 de los anticuerpos se superponen con los epítopos para 2C4 o Herceptin®, se realizó ELISA de agrupamiento competitivo.
- 10 Se recubrieron placas de 96 pocillos de unión de medio Costar 3695 con 0,5 µg/ml de Herceptin® o 2 µg/ml de 2C4 en PBS durante la noche a 4 °C. Las placas recubiertas se lavaron y luego se bloquearon con 1 % de leche/PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Los anticuerpos se valoraron a 1000 ng/ml, 100 ng/ml y 10 ng/ml y se pre-incubaron con 30 ng/ml de hErbB2 (ECD) durante 2 horas. La mezcla de anticuerpo/ErbB2 se transfirió a placas bloqueadas y se incubaron durante 1 hora a TA. Para detectar ErbB2 unido, las placas se lavaron y se incubaron con 1 µg/ml de anti-ErbB2 de cabra (R&D Systems, catálogo N.º AF1129) durante 1 hora a TA. Se añadió anticuerpo secundario anti-Fc de IgG de cabra de conejo-POD (catálogo de Pierce N.º 31433, 400 ng/ml) a las placas y se incubaron durante 1 hora a TA. Después de un amplio lavado, se añadió sustrato TMB (Neogen) y se incubó con las placas durante 10-18 minutos a TA. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de HCl 1 N, y la densidad óptica a 450 nm se leyó en un lector de microplacas. La Figura 9 ilustra la capacidad de unión de ErbB2 a Herceptin® (A) y 2C4 (B) en presencia de 8 anticuerpos anti-ErbB2, mAb 1.71.3, o un mAb de control de isotipo irrelevante generado en casa. Ninguno de los anticuerpos anti-ErbB2 analizados bloquea la unión de ErbB2 a 2C4 o Herceptin®, sugiriendo que los anticuerpos pertenecen a una agrupación diferente a 2C4 o Herceptin®.
- 15
- 20

25 La anterior descripción detallada se ha dado para claridad de entendimiento solo y no deben entenderse limitaciones innecesarias de la misma ya que las modificaciones serán obvias para aquellos expertos en la materia. No es una admisión de que cualquiera de la información en el presente documento proporcione estado de la técnica o sea relevante para las invenciones actualmente reivindicadas, o que cualquier publicación específicamente o implícitamente referenciada sea estado de la técnica. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Astrazeneca AB
- <120> ANTICUERPOS CONTRA ERBB2
- 40 <130> ASTR-006/01WO
- <150> US 60/835.514
- <151> 04-08-2006
- 45 <160> 59
- <170> PatentIn versión 3.4
- 50 <210> 1
- <211> 387
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 661 952 T3

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtgg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
 cagcacccag ggaaggcct ggagtggatt ggatacatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccctg cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gactgcgcgc gacacggcgc tgtattactg tgcgagagag 300
 ggcccgatta ctattgttcg gggagtttac tactacttct acggtatgga cgtctggggc 360
 caagggacca cggtcaccgt ctctca 387

5

<210> 2
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

10

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Pro Ile Thr Ile Val Arg Gly Val Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Phe Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

15

<210> 3
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 661 952 T3

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca ccctggaca gccggcctcc 60
 atctctctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagacctt tttgtattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ccctgatct atgaagtttc caaccggttc 180
 tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agccgagtgg aggetgagga tgttgggatt tattactgca tgcaaagtaa acagcttctc 300
 cggacgttcg gcccaaggac caaggtggaa atcaaaa 336

5 <210> 4
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95

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

15 <210> 5
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

ES 2 661 952 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctgggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt cegccaggct 120
 ccacggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tcagagaca acgccaagaa ctcaactgat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

5 <210> 6
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

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

15 <210> 7
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

ES 2 661 952 T3

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60
 atcacctgca agtccagcca gagtgtcttt ttccgctcca acaataagaa ctgcttagct 120
 tgggtaccagc agagaccagg acagcctcct aatttgetca tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct 300
 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

5 <210> 8
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

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

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

Ser Asn Asn Lys Asn Cys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45

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

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

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

Tyr Phe Gly Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile

100 105 110

10 Lys

<210> .9
 <211> 351
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

ES 2 661 952 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agctattgga tgcactgggt cgcagact 120
 ccaggaagg ggcctggagt ggtggccaac ataaagcagg atggaagtga gaaatactat 180
 gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgcgt attactgtgc gagtttccgg 300
 gactacggta tggacgtctg gggccaaggg accacggtea ccgtctctc a 351

<210> 10
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 10

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

10

<210> 11
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 11

ES 2 661 952 T3

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggcattagc aatcatttag cctggtttca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcctt gatctatggt gcatccagtt tgcaaaccgg ggtcccatca 180
 aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caagttatct ctgccaacag tataaagggt acccgatcac cttcggccaa 300
 gggacacgac tggagattaa a 321

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

<400> 12

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 Gly Ile Ser Asn His
 20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Lys Gly Tyr Pro Ile
 85 90 95

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

10

15 <210> 13
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

ES 2 661 952 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

5 <210> 14
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10
 15 <210> 15
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<900> 15

ES 2 661 952 T3

gacategtga tgaccagtc tccagactcc ctggetgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcacctgca agtccagcca gagtgttttt ttccgctcca acaataagaa ctgcttaact 120
 tggtaaccagc agagaccggg acagcctcct aacctgctca tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcaacaacc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct 300
 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 16
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 16

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

10

Lys

<210> 17
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 17

ES 2 661 952 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tctgtgagc cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt cgcaccaggt 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt cacogtctcc 360
 tca 363

5 <210> 18
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 19
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 19

ES 2 661 952 T3

gacatcgtga tgaccagcgc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcacctgca agtccagcca gagtggtttt ttccgctoca acaataagaa ctgcttagct 120
 tggtagccagc agagaccagg acagcctcct aacctgctca tttactgggc atctaaccgg 180
 gagtccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtgtg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct 300
 ccattcactt tcggccttg gaccaaagtg gatatcaaa 339

5 <210> 20
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 20

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

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

Ser Asn Asn Lys Asn Cys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45

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

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

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

Tyr Phe Gly Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

10 Lys

<210> 21
 <211> 363
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 21

ES 2 661 952 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctgggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tccctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt cggccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 22
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 22

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

10

<210> 23
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 23

ES 2 661 952 T3

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggtgtgt ctctgggcca gagggccacc 60
 atcacctgca agtccagcca gagggttttt ttccgctcca acaataagaa ctgcttagct 120
 tgggtaccagc agagaccagg acagcctcct aacctctct tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct 300
 ccattcactc tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 24

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

Lys

10

<210> 25
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 25

ES 2 661 952 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tctctgtcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catttactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag cgccgaggac acggctgtgt attcctgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactaacta ctttgactac tggggccagg gaacctggt caccgtctcc 360
 tca 363

5 <210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 26

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

10
 15 <210> 27
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 27

ES 2 661 952 T3

gacatcgtga tgaccagtc tccaggtcc ctggttggt ctctgggoga gagggccacc 60
 atcacctgca agtccagcca gagtgtttt ttccgctcca acaataagaa ctgcttagct 120
 tggtagcagc agagaccagg acagtctctt aacctgctca tttactgggc atctaccogg 180
 gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct 300
 ccattcactt tggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

5 <210> 28
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 28

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

10 Lys

15 <210> 29
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 29

ES 2 661 952 T3

gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ctggtaaacg ctgggggggc cctgagactc 60
 tctctgagc cctctggatt caccttcagt agctatacca tgaactgggt cgcaccaggt 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catttactac 180
 gcagactcag tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag cgccgaggac acggctgtgt attcctgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

5 <210> 30
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 30

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

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

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

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

15 <210> 31
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

ES 2 661 952 T3

```

gacatcgtga tgaccagtc tccaggctcc ctggttgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcacctgca agtccagcca gagtgttttt ttccgctcca acaataagaa ctgcttagct      120
tggtagcagc agagaccagg acagtctcct aacctgctca tttactgggc atctaccgg      180
gaatecgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct      300
ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa      339

```

5

<210> 32
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 32

```

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

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

Ser Asn Asn Lys Asn Cys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
                35           40           45

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

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

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

Tyr Phe Gly Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
                100          105          110

```

10

Lys

15

<210> 33
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 33

ES 2 661 952 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccagget 120
 ccaggggaagg ggetggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

5

<210> 34
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 34

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

10

15

<210> 35
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 35

ES 2 661 952 T3

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcacctgca agtccagcca gagtgttttt ttccgctcca acaataagaa ctgcttagct 120
 tggtaaccagc agagaccagg acagcctcct aacctactca tttactgggc atcttcccg 180
 gaatccgggg tccctgaccg gttcagtggc agcgggtctg ggacagattt cgcctccacc 240
 atcagcagcc tgcagactga ggatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttggttct 300
 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

5 <210> 36
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

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

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

Ser Asn Asn Lys Asn Cys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45

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

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

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

Tyr Phe Gly Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

10 Lys

15 <210> 37
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 37

ES 2 661 952 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctgggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagga 300
 gatggctaca attactacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

5 <210> 38
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 38

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

10 <210> 39
 <211> 339
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 39

ES 2 661 952 T3

gacatcgtga tgaccagtt tccagactcc ctggctgtgt ctctggacga aagggccacc 60
atcaactgca agtccagtca gagggttttt ttcgctcca acaataagaa ctgcttagct 120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aatctgctca tttactgggc atctaccggg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggct ttttattact gtcagcaata ttatagttct 300
ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

5 <210> 40
<211> 113
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

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

10 Lys

<210> 41
<211> 369
<212> ADN
15 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

ES 2 661 952 T3

gaggtagcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggttcagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tctctgacag cctctggatt ccccttcagt agctacgaca tgcaactgggt ccgccaagct 120
 acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attggtactg ctggtgacac attctatcca 180
 ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc cttgtatctt 240
 caaatgaaca gcttgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agaggggtat 300
 agcagtgggc gctacttcta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
 gtctcctca 369

5 <210> 42
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 42

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

10
 15 <210> 43
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 43

ES 2 661 952 T3

gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atatcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120
 tticagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taactgggac 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaaggtac aactgggccc 300
 ctcactttcg gccggaggac caaggtggag atcaaa 336

5 <210> 44
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 44

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

10
 15 <210> 45
 <211> 1255
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 45

ES 2 661 952 T3

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115 120 125

ES 2 661 952 T3

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
210 215 220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
340 345 350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
355 360 365

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp

ES 2 661 952 T3

370						375										380
Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe	
385					390					395					400	
Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro	
				405					410					415		
Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg	
			420					425					430			
Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu	
		435					440						445			
Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly	
	450					455					460					
Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val	
465					470					475					480	
Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr	
				485					490					495		
Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His	
			500					505					510			
Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	Cys	
		515					520					525				
Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	Cys	
	530					535					540					
Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Asn	Ala	Arg	His	Cys	
545					550					555					560	
Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Cys	
				565					570					575		
Phe	Gly	Pro	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Val	Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys	Asp	
			580					585					590			
Pro	Pro	Phe	Cys	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	Leu	
		595					600					605				
Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys	Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Cys	Gln	
	610					615					620					

ES 2 661 952 T3

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
645 650 655

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
660 665 670

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
675 680 685

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
690 695 700

Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
705 710 715 720

Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
725 730 735

Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
740 745 750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
755 760 765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
770 775 780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
785 790 795 800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
805 810 815

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
820 825 830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
835 840 845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
850 855 860

ES 2 661 952 T3

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
865 870 875 880

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
885 890 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
915 920 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
930 935 940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
945 950 955 960

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
965 970 975

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
980 985 990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
995 1000 1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
1010 1015 1020

Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
1025 1030 1035

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
1040 1045 1050

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
1055 1060 1065

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
1070 1075 1080

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
1085 1090 1095

ES 2 661 952 T3

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
 1100 1105 1110

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
 1115 1120 1125

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
 1130 1135 1140

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
 1145 1150 1155

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
 1160 1165 1170

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
 1175 1180 1185

Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
 1190 1195 1200

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
 1205 1210 1215

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
 1220 1225 1230

Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255

<210> 46
 <211> 1624
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 46

ES 2 661 952 T3

gcgtgctgat caggactgca cacagagaac tcacatgga atttgggctg cgctggggtt 60
 tccttgttgc tattttaaaa gatgtccagt gtgacgtgca actggtggag tccgggggag 120
 gcttagttca gcctgggggg tcctgagac tctctgocg agcctctgga ttcgcctaca 180
 gtagtttttg gatgcactgg gtccgccaag ctccagggag gggctctggg tgggtctcac 240
 gtattaatcc tgatgggaga atcacagtct acgcggaocg cgtaaagggc cgattcacca 300
 tctccagaga caacgccaag aacacgctct atctccaaat gaacaacctg agagccgagg 360
 acacggctgt ttattactgt gcaagagggg cacgatttct ggagttgact tctaggggac 420
 aaatggacca gtggggccag ggaacctggt tcactgtctc ctacagcctcc accaagggcc 480
 catcggctct cccctggca cctctctcca agagcacctc tgggggcaca gggccctgg 540
 gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc 600
 tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgctg tctacagtc ctacaggactc tactcctca 660
 gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga 720
 atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaatct tgtgacaaaa 780
 ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct 840
 tcccccaaa acccaaggac acctcatga tctcccgac cctgaggtc acatgcgtgg 900
 tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttaa ctggtacgtg gacggcgtgg 960
 aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg tacctgtgtg 1020
 tcagcgtctc cacogtctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcgaag 1080
 tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacct ctccaaagcc aaagggcagc 1140
 cccgagaacc acaggtgtac acctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg 1200
 tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga 1260
 gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggt 1320
 ccttcttctc ctacagcaag ctaccctggg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct 1380
 tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag agcctctccc 1440
 tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgg caagccccg ctccccgggc tctcgcggtc 1500
 gcacgaggat gcttggcacg taccctgtgt acatacttcc cggggcctca gcatggaaat 1560
 aaagcaccca gcgctgccct ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620
 aaaa 1624

<210> 47
 <211> 938
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 661 952 T3

<400> 47

```

ggtcaggaca cagcatggac atgaggggtcc ccgctcagct cctggggctc ctgctactct    60
ggctccgagg tgcagatgt gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcag    120
ctgtaggaga cagagtcacc atcgcttgcc gggcaagtca gagcattgcc gactatttaa    180
attggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaaactcct gatctatggt tcatccagtt    240
tgcaaagcgg ggteccatca aggttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctct    300
ccatcagcag tctacaaact ggagattttg caacttacta ctgtcaacag agtcacactt    360
cccccttcac ttttgcgga gggaccaagg tgcagatgaa gcgaactgtg gctgcacat    420
ctgtcttcat cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt    480
gctgctgaa taacttctat ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc    540
tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca    600
gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct    660
gcgaagtcac ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt    720
gttagagggg gaagtgcacc cacctgctcc tcagttccag cctgaccccc tccatcctt    780
tgccctctga ccctttttcc acaggggacc taccctatt ggggtcctcc agctcatctt    840
tcacctcacc ccctcctcc tccttgctt taattatgct aatggtggag gagaatgaat    900
aaataaagtg aatctttgca ctaaaaaaaaa aaaaaaaaa    938

```

5 <210> 48
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 48

Gln Gln Tyr Ser Ser Pro Phe Thr
 1 5

15 <210> 49
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 49

Gln Gln Tyr Tyr Ser Pro Phe Thr
 1 5

25 <210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 50

ES 2 661 952 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 Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 51
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 51

5

ES 2 661 952 T3

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

Lys

- <210> 52
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 52

5

ES 2 661 952 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95

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

<210> 53
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (100)..(101)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10

<400> 53

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30

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

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

15

ES 2 661 952 T3

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Trp Xaa Xaa Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

5
<210> 54
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10
<220>
<221> misc_feature
<222> (99)..(100)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15
<220>
<221> misc_feature
<222> (106)..(106)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 54

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Xaa Xaa Asp Gly Tyr Asn Tyr Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

20

ES 2 661 952 T3

<210> 55
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 55

```

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60

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

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

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

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

10

<210> 56
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (98)..(98)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (103)..(104)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25

<400> 56

```

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

ES 2 661 952 T3

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Arg Xaa Gly Tyr Ser Ser Xaa Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110

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

<210> 57
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (98)..(101)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10

<400> 57

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

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

15

ES 2 661 952 T3

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

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 58
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (98)..(99)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 58

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Xaa Xaa Arg Asp Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

15 Val Thr Val Ser Ser
 115

20 <210> 59
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 661 952 T3

<222> (100)..(102)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 59

5

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Ile Thr Met Val Arg Gly Val Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano aislado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se une específicamente a ErbB2, e inhibe la fosforilación de ErbB2 en células MCF7 con una CE₅₀ inferior a 50 ng/ml, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, en el que las tres CDRs de cadena pesada y las tres CDRs de cadena ligera están seleccionadas del grupo que consiste en:
- (a) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 8;
- (b) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 14, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 16;
- (c) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 18, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 20;
- (d) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 22, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 24;
- (e) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 26, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 28;
- (f) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 30, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 32;
- (g) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 34, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 36; o
- (h) las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 38, y las tres CDRs de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 40,
- en el que las CDRs son como se definen por Kabat, y
- en el que dichas regiones CDR tienen menos de tres sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de tres o menos sustituciones de aminoácidos no conservativas, en el que cada sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en (i) sustitución de un residuo que no es de la línea germinal con un residuo de la línea germinal; (ii) sustitución para eliminar pares de asparagina-glicina; (iii) sustitución para eliminar una cisteína no emparejada; (iv) sustitución de un residuo de la línea germinal con un residuo que no es de la línea germinal; y (v) sustitución conservativa.
2. Una composición que comprende un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, según la reivindicación 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, según la reivindicación 1.
4. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 3, en el que el vector comprende opcionalmente una secuencia de control de la expresión operativamente unida a la molécula de ácido nucleico.
5. Una célula hospedadora que comprende un vector de la reivindicación 4.
6. Un método de producción de un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende cultivar una célula hospedadora de la reivindicación 5 bajo condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo.
7. Un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, según la reivindicación 1, o una composición según la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de cáncer.
8. Un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, o composición según la reivindicación 7 en el que el cáncer está seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello, próstata, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, cáncer pancreático y glioblastomas.
9. Un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, según la reivindicación 1, o una composición según la reivindicación 2 para su uso en la inhibición de la proliferación de una célula cancerosa que expresa ErbB2.

10. Un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, según la reivindicación 1, o una composición según la reivindicación 2 para su uso en la inhibición de una actividad de ErbB2 en una célula que expresa ErbB2, donde la actividad de ErbB2 en la célula se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 (a) fosforilación de ErbB2;
 (b) activación de la vía MAPK;
 (c) activación de la vía PI3K;
 (d) inhibición de CDC2; y
10 (e) combinaciones de las mismas.

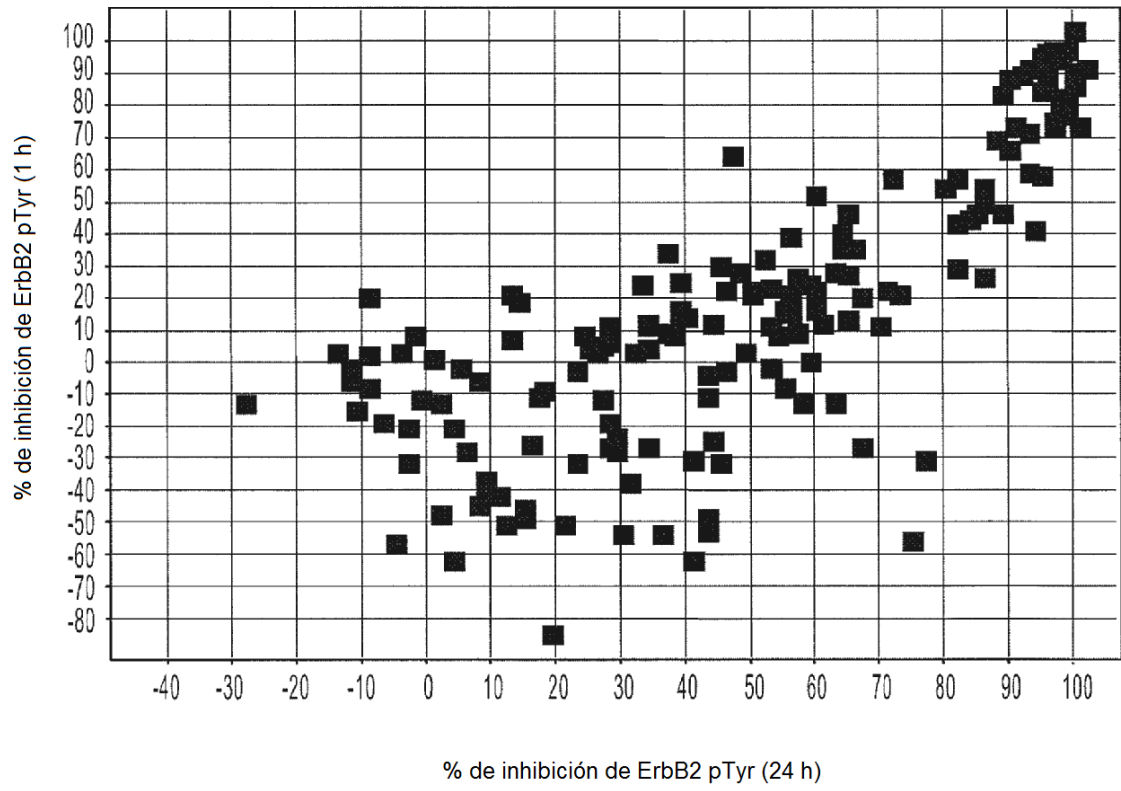


Fig. 1

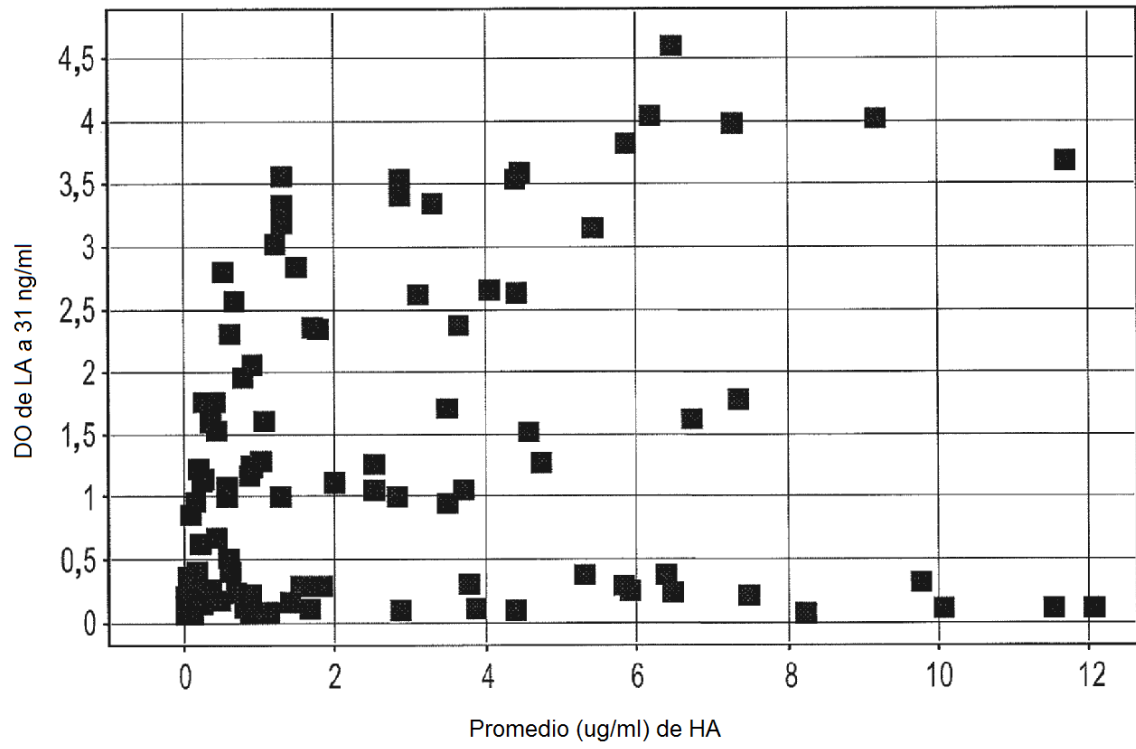


Fig. 2

Fig. 3

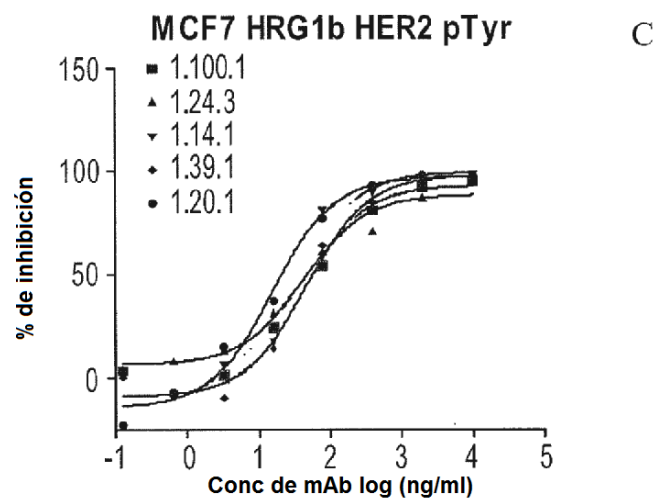
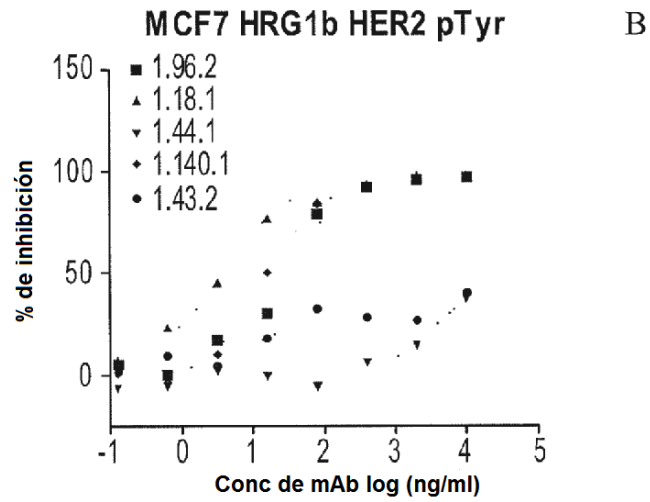
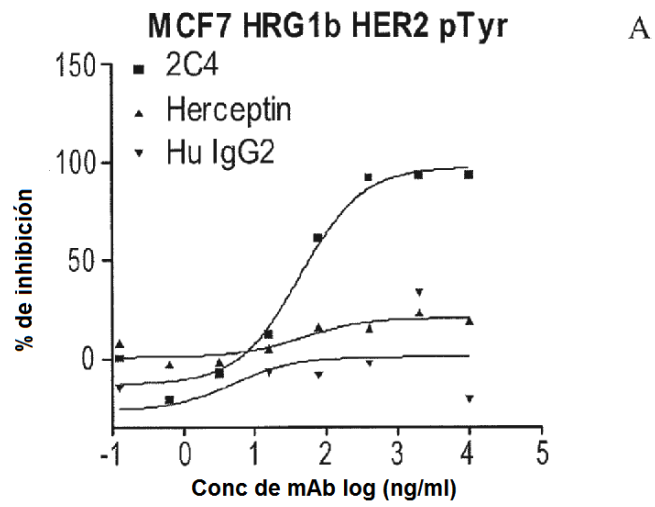


Fig. 4

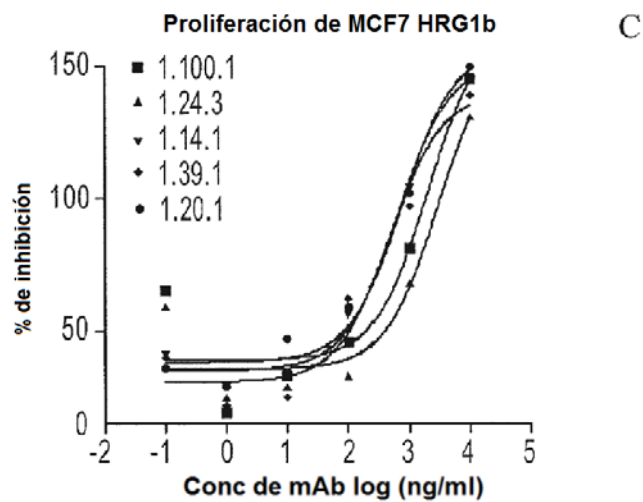
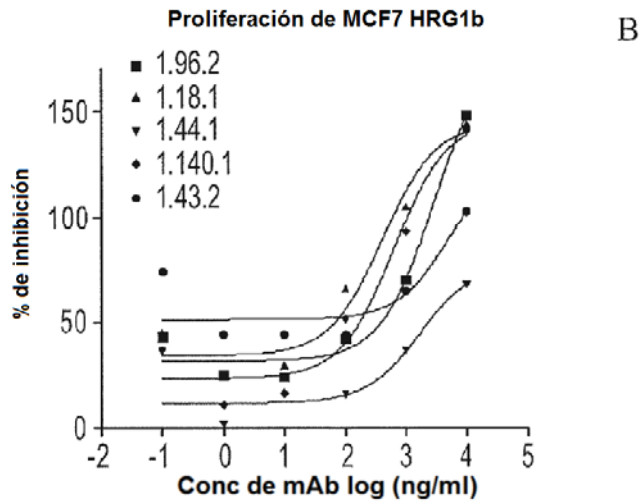
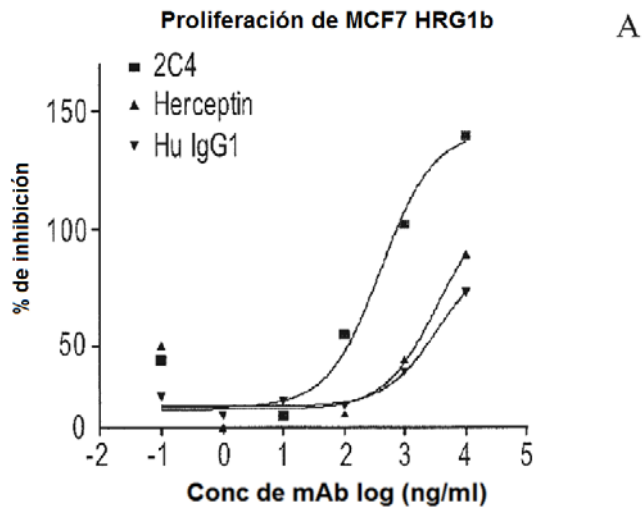
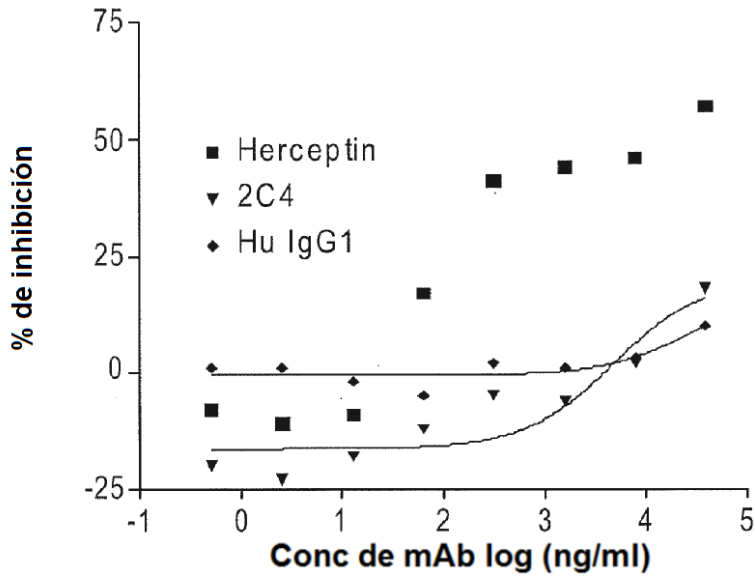


Fig. 5

**Proliferación de BT474 -
Respuesta a dosis**

A



Proliferación de BT474

B

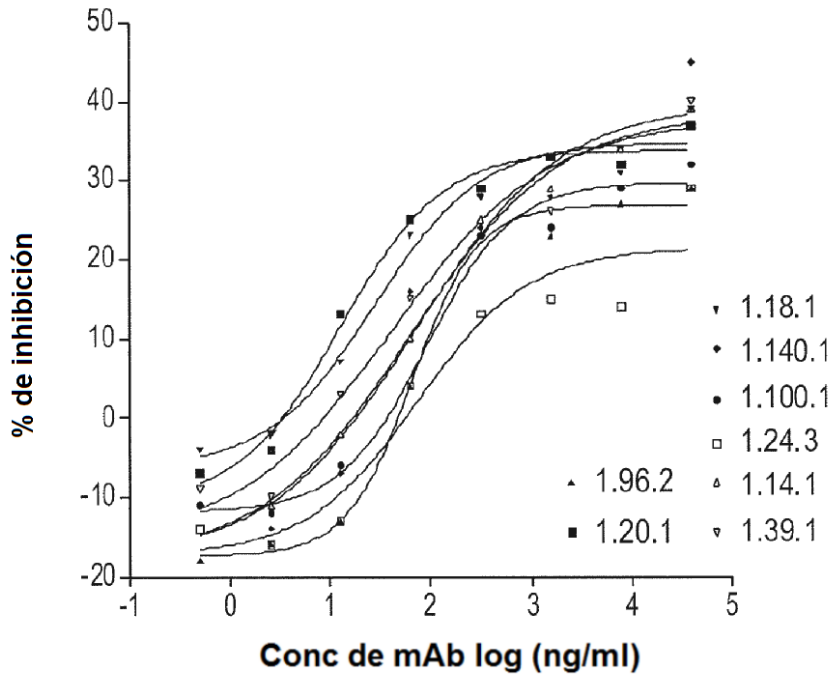
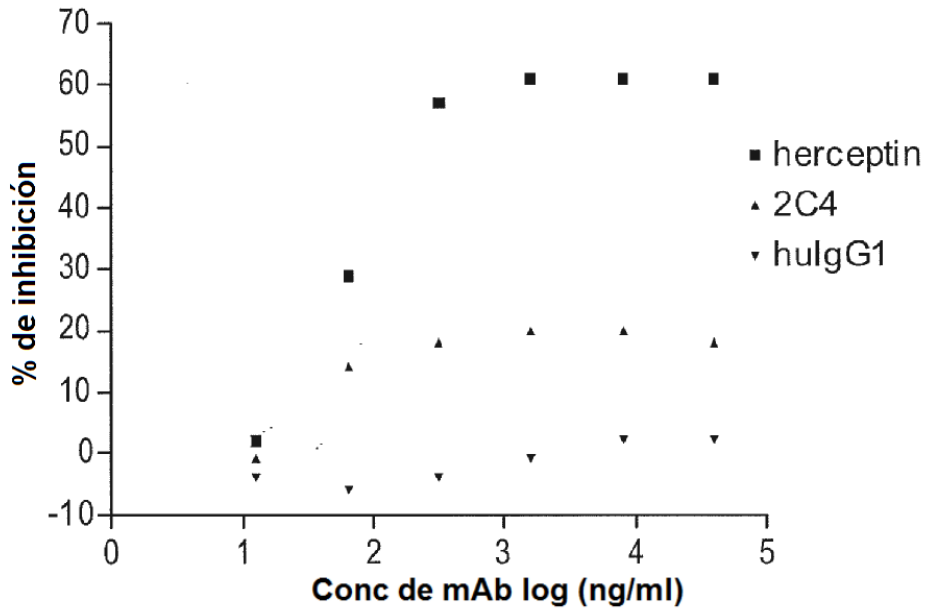


Fig. 6

Proliferación de SKBR3 - Respuesta a dosis

A



Proliferación de SKBR3 - Respuesta a dosis

B

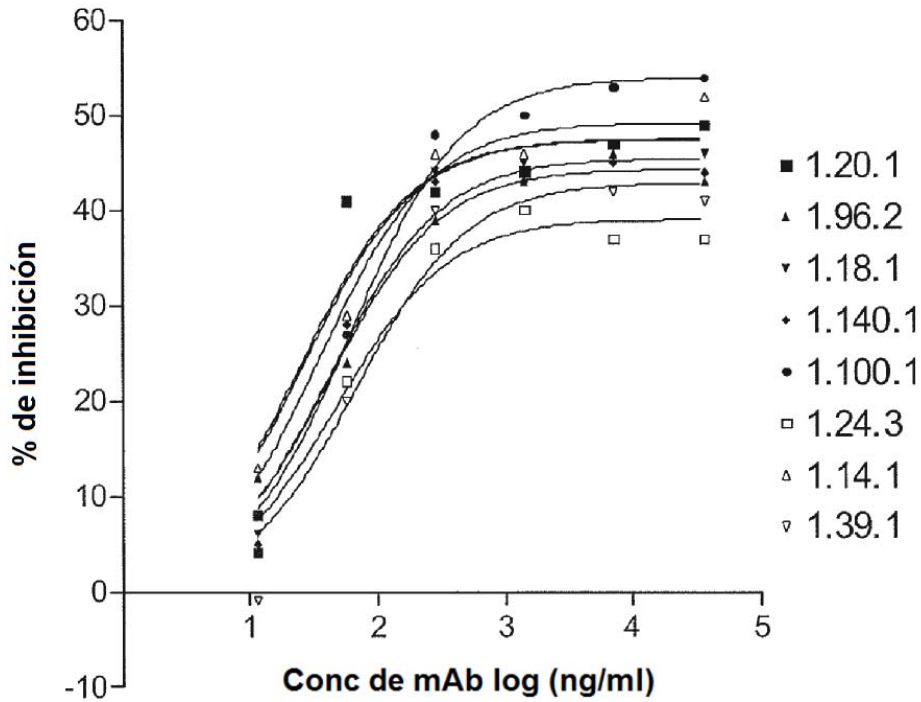
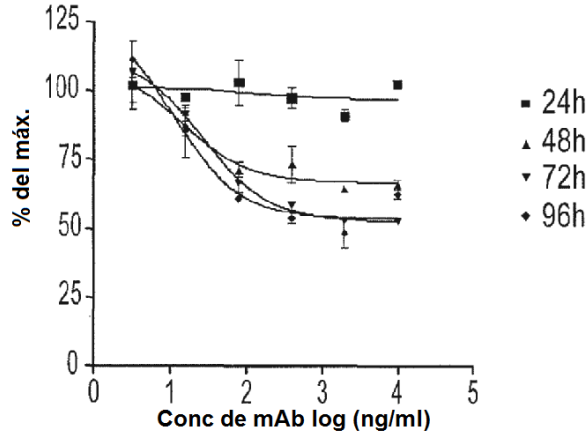


Fig. 7

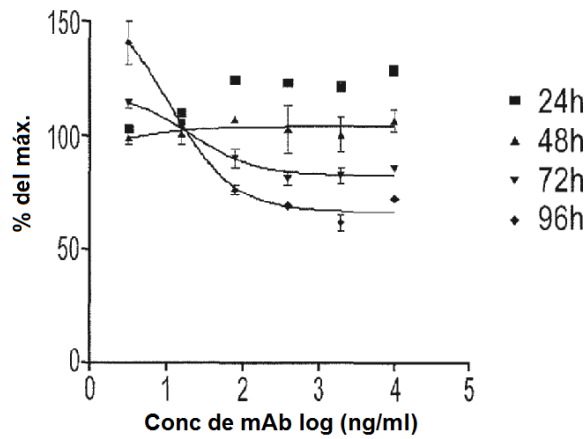
Señal de BT474 pTyr –
Respuesta a dosis de 1.18.1

A



Señal de BT474 pTyr –
Respuesta a dosis de Herceptin

B



Señal de BT474 pTyr –
Respuesta a dosis de 2C4

C

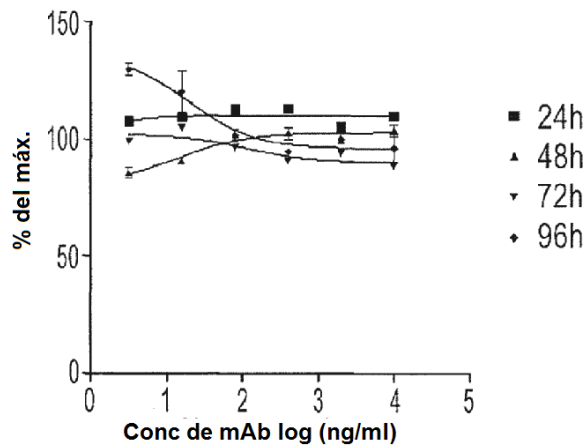
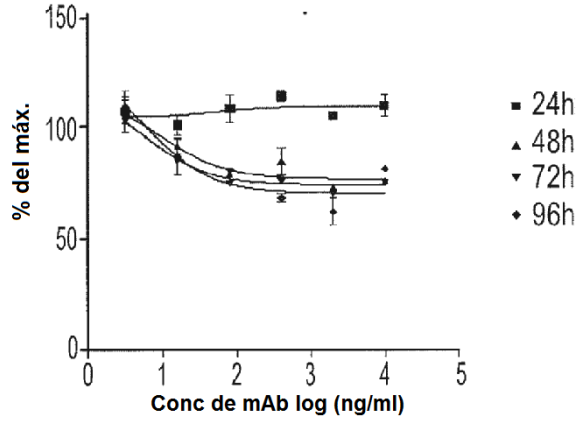


Fig. 8

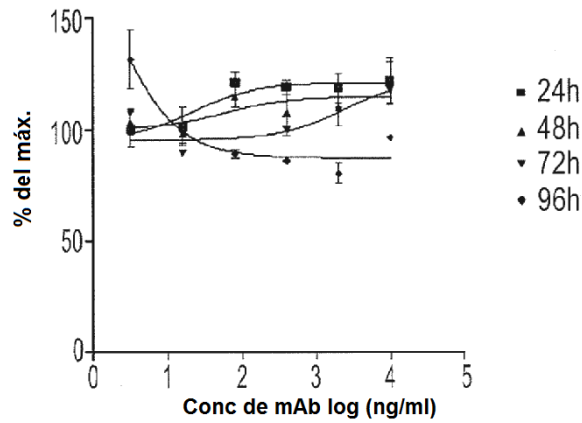
Señal/célula de BT474 pTyr –
Respuesta a dosis de 1.18.1

A



Señal/célula de BT474 pTyr –
Respuesta a dosis de Herceptin

B



Señal/célula de BT474 pTyr –
Respuesta a dosis de 2C4

C

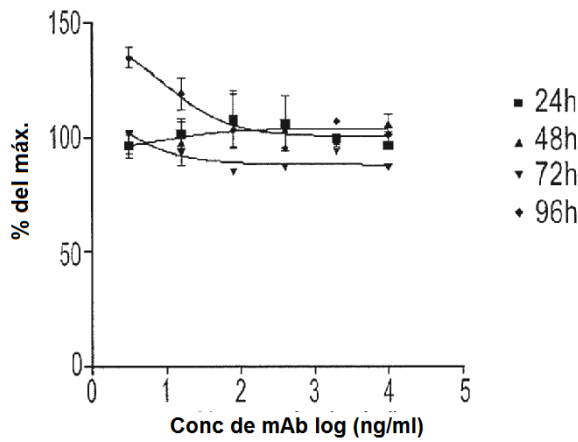


Fig. 9

