

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 680**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2009** **PCT/US2009/032220**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2009** **WO09099829**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2009** **E 09709065 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018** **EP 2238172**

54 Título: **Composición que comprende un anticuerpo que se une al dominio II de HER2 y variantes ácidas del mismo**

30 Prioridad:

30.01.2008 US 24825 P

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

21.05.2018

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:

HARRIS, REED, J. y
MOTCHNIK, PAUL, A.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 668 680 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende un anticuerpo que se une al dominio II de HER2 y variantes ácidas del mismo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición que comprende una especie principal de anticuerpo de HER2 que se une al dominio II de HER2 y variantes ácidas del mismo. La invención también se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden la composición y usos terapéuticos para la composición.

10

Antecedentes de la invención**Anticuerpos de HER2**

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

20 EGFR, codificado por el gen *erbB1*, se ha implicado causalmente en tumores malignos humanos. En particular, se ha observado una mayor expresión de EGFR en cáncer de mama, de vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago, así como en glioblastomas. La mayor expresión del receptor EGFR se asocia a menudo con la mayor producción del ligando del EGFR, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), por las mismas células tumorales que producen la activación del receptor por una ruta estimuladora autocrina. Baselga y Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Se han evaluado los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR o sus ligandos, TGF- α y EGF, como agentes terapéuticos en el tratamiento de dichos tumores malignos. Véase, *por ejemplo*, Baselga y Mendelsohn., *citado anteriormente*; Masui y col. *Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); y Wu y col. *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995).

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

Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos proteínicos p185^{neu} de rata y HER2 humano. Drebin y colaboradores han producido anticuerpos contra el producto del gen *neu* de rata, p185^{neu}. Véase, por ejemplo, Drebin y col., *Cell* 41: 695-706 (1985); Myers y col., *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); y documento WO94/22478. Drebin y col. *Oncogene* 2:273-277 (1988) publican que mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones distintas de p185^{neu} produce efectos antitumorales sinérgicos en células NIH-3T3 transformadas por *neu* en ratones sin pelo. Véase también la patente de EE.UU. 5.824.311 concedida el 20 de octubre, 1998.

55 Hudziak y col., *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989) describen la generación de un panel de anticuerpos HER2 que se caracterizaron usando la línea celular de tumor de mama humano SK-BR-3. Se determinó la proliferación celular relativa de las células SK-BR-3 después de exposición a los anticuerpos, mediante tinción con cristal violeta de las monocapas después de 72 horas. Mediante este ensayo, se obtuvo la inhibición máxima con el anticuerpo llamado 4D5 que inhibía la proliferación celular en 56 %. Otros anticuerpos del panel reducían la proliferación celular en menor extensión en este ensayo. Se encontró además que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba las líneas celulares de tumor de mama que expresaban en exceso HER2 a los efectos citotóxicos del TNF- α . Véase también, la patente de EE.UU. n° 5.677.171 concedida el 14 de octubre, 1997. Los anticuerpos contra HER2 discutidos por Hudziak y col. son caracterizados adicionalmente por Fendly y col. *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts y col. *In Vitro* 26 (3): 59A (1990); Sarup y col. *Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard y col. *J. Clin. Immunol.* 11 (3): 117-127 (1991); Kumar y col. *Mol. Cell. Biol.* 11 (2): 979-986 (1991); Lewis y col. *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras y col. *Oncogene* 9:1829-1838 (1994); Vitetta y col. *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski y col. *J. Biol. Chem.* 269 (20): 14661-14665 (1994); Scott y col. *J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991);

D'souza y col. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7202–7206 (1994); Lewis y col. Cancer Research 56:1457-1465 (1996); y Schaefer y col. Oncogene 15:1385–1394 (1997).

Una versión humanizada recombinante del anticuerpo contra HER2 murino 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Trastuzumab o HERCEPTIN®; patente de EE.UU. n.º 5.821.337) es clínicamente activa en pacientes con cánceres de mama metastáticos que expresan en exceso HER2 que han recibido una amplia terapia anticancerígena previa (Baselga y col., J. Clin. Oncol. 14:737-744 (1996)). Trastuzumab recibió la aprobación para la comercialización de la Administración de Medicamentos y Alimentos el 25 de septiembre, 1998, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastático cuyos tumores expresaban en exceso la proteína HER2.

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

La selección por homología ha dado como resultado la identificación de otros dos miembros de la familia de receptores HER; HER3 (patentes de EE.UU. n.º 5.183.884 y 5.480.968 así como Kraus y col. PNAS (USA) 86:9193–9197 (1989)) y HER4 (solicitud de patente EP 599.274; Plowman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993); y Plowman y col., Nature, 366:473-475 (1993)). Ambos receptores presentan una mayor expresión en al menos algunas líneas celulares de cáncer de mama.

Los receptores HER en general se encuentran en diferentes combinaciones en las células y se cree que la heterodimerización aumenta la diversidad de respuestas celulares a varios ligandos de HER (Earp y col. Breast Cancer Research and Treatment 35:115–132 (1995)). El EGFR se une por seis ligandos diferentes; factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), anfieregulina (HB-EGF), factor de crecimiento epidérmico que se une a heparina (HB-EGF), betacelulina y epieregulina (Groenen y col. Growth Factors 11:235–257 (1994)). Una familia de proteínas heregulinas que resultan del corte y empalme alternativo de un solo gen, son los ligandos para HER3 y HER4. La familia de heregulinas incluye heregulinas alfa, beta y gamma (Holmes y col., Science, 256:1205-1210 (1992); patente de Estados Unidos n.º 5.641.869; y Schaefer y col. Oncogene 15:1385–1394 (1997)); factores de diferenciación de neu (NDF), factores de crecimiento glial (GGF); inductor de la actividad del receptor de acetilcolina (ARIA); y factor derivado de neuronas motoras y sensoriales (SMDf). Para una revisión, véase Groenen y col. Growth Factors 11:235–257 (1994); Lemke, G. Molec. & Cell. Neurosci. 7:247–262 (1996) y Lee y col. Pharm. Rev. 47: 51-85 (1995). Recientemente, se han identificado tres ligandos de HER adicionales; la neuregulina-2 (NRG-2) que se describe que se une a HER3 o HER4 (Chang y col. Nature 387 509–512 (1997); y Carraway y col. Nature 387:512–516 (1997)); la neuregulina-3 que se une a HER4 (Zhang y col. PNAS (USA) 94(18):9562–7 (1997)); y la neuregulina-4 que se une a HER4 (Harari y col. Oncogene 18:2681–89 (1999)), HB-EGF, betacelulina y epieregulina también se unen a HER4.

Mientras que el EGF y el TGF α no se unen a HER2, el EGF estimula que el EGFR y HER2 formen un heterodímero, que activa el EGFR y produce la transforilación de HER2 en el heterodímero. Parece que la dimerización y/o transforilación activan la HER2 tirosina quinasa. Véase Earp y col., anteriormente citado. Asimismo, cuando HER3 es expresado conjuntamente con HER2, se forma un complejo de señalización activo y los anticuerpos dirigidos contra HER2 son capaces de alterar este complejo (Sliwkowski y col., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994)). Adicionalmente, la afinidad del HER3 por la heregulina (HRG) aumenta a un estado de afinidad mayor cuando es expresado conjuntamente con HER2. Véanse también, Levi y col., Journal of Neuroscience 15:1329–1340 (1995); Morrissey y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1431-1435 (1995); y Lewis y col., Cancer Res., 56:1457–1465 (1996) con respecto al complejo de proteínas HER2-HER3. HER4, tal como HER3, forma un complejo de señalización activo con HER2 (Carraway y Cantley, Cell 78:5–8 (1994)).

Para dirigirse a la ruta de señalización de HER, se desarrolló rhuMAb 2C4 (Pertuzumab) como un anticuerpo humanizado que inhibe la dimerización de HER2 con otros receptores HER, inhibiendo así la fosforilación y activación dirigidas por ligando, y la activación corriente abajo de las rutas de RAS y AKT. En un ensayo en fase I de Pertuzumab como un solo agente para tratar tumores sólidos, 3 sujetos con cáncer de ovario avanzado se trataron con Pertuzumab. Uno tuvo una respuesta parcial duradera, y un sujeto adicional tuvo la enfermedad estable durante 15 semanas. Agus y col. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 22: 192, Abstract 771 (2003).

Composiciones de variantes de anticuerpo

La Patente de Estados Unidos n.º 6.339.142 describe una composición de anticuerpo de HER2 que comprende una mezcla de anticuerpo dirigido contra HER2 y una o más variantes ácidas del mismo, en la que la cantidad de la(s) variante(s) ácida(s) es menor de aproximadamente 25 %. Trastuzumab es un ejemplo de anticuerpo para HER2.

Reidy col. Poster presentado en la conferencia de Productos Farmacéuticos Biotecnológicos Bien Caracterizados (enero de 2003) "Effects of Cell Culture Process Changes on Humanized Antibody Characteristics" describe una composición de anticuerpo IgG1 humanizado, sin nombre, con heterogeneidades N-terminales debido a combinaciones con el péptido señal VHS, glutamina N-terminal y ácido piroglutámico en la cadena pesada del mismo.

Harris y col. "The Ideal Chromatographic Antibody Characterization Method" charla presentada en la Conferencia de Producción de Anticuerpos IBC (febrero, 2002) informa sobre una extensión de VHS sobre la cadena pesada de E25, un anticuerpo anti-IgE humanizado.

Rouse et al. Poster presentado en WCBP "'Top Down' Glycoprotein Characterization by High Resolution Mass Spectrometry and Its Application to Biopharmaceutical Development" (6-9 de enero de 2004) describe una composición de anticuerpos monoclonales con heterogeneidad N-terminal resultante de restos de péptido señal ³AHS o ⁻²HS en la cadena ligera del mismo.

En una presentación en el Encuentro de IBC (septiembre de 2000) "Strategic Use of Comparability Studies and Assays for Well Characterized Biologicals," Jill Porter analizó una forma de elución tardía de ZENAPAX™ con tres restos de aminoácidos extra en la cadena pesada del mismo.

El documento US2006/0018899 describe una composición que comprende un anticuerpo de pertuzumab de especie principal y una variante de extensión líder amino-terminal, así como otras formas de variante del anticuerpo de pertuzumab.

Sumario de la invención

De acuerdo con primer aspecto, la invención se refiere a una composición de acuerdo con la reivindicación 1.

De forma deseable, la cantidad de las variantes ácidas es menor de aproximadamente 25 %.

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las composiciones en un portador farmacéuticamente aceptable.

Adicionalmente, la invención se refiere a la formulación farmacéutica para su uso en

un método de tratamiento de cáncer HER2 positivo en un paciente que comprende la administración de la formulación farmacéutica al paciente en una cantidad eficaz para tratar el cáncer. Con respecto a tales métodos, como se demuestra en el ejemplo del presente documento, preferentemente el anticuerpo de especie principal y variantes ácidas tienen esencialmente la misma farmacocinética.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de producción de una composición de acuerdo con la reivindicación 13.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona un esquema de la estructura proteica de HER2 y secuencias de aminoácidos para los dominios I-IV (SEC ID N.º 19-22, respectivamente) del dominio extracelular de la misma.

Las Figuras 2A y 2B representan alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los dominios ligero variable (V_L) (Fig. 2A) y pesado variable (V_H) (Fig. 2B) del anticuerpo monoclonal murino 2C4 (SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente); dominios V_L y V_H de la versión de 2C4 humanizado 574 (SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente); y marcos consenso V_L y V_H humanos (hum κ1, subgrupo kappa ligero I; humIII, subgrupo pesado III) (SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente). Los asteriscos identifican diferencias entre 2C4 versión 574 y el anticuerpo monoclonal murino 2C4 o entre 2C4 humanizado versión 574 y el marco humano. Las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) están entre corchetes.

Las Figuras 3A y 3B muestran las secuencias de aminoácidos de cadena ligera (SEQ ID NO: 15) y cadena pesada (SEQ ID NO: 16) de Pertuzumab. Las CDR se muestran en negrita. El resto de carbohidrato está unido con Asn 299 de la cadena pesada.

Las Figuras 4A y 4B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID No. 17) y cadena pesada de Pertuzumab, incluyendo cada una secuencia peptídica señal amino-terminal intacta (SEQ ID No. 18).

La Figura 5 representa, esquemáticamente, la unión de 2C4 en el sitio de unión heterodimérico de HER2, previniendo de este modo la heterodimerización con EGFR o HER3 activado.

La Figura 6 representa el acoplamiento de HER2/HER3 con las rutas de MAPK y Akt.

La Figura 7 compara las actividades de Trastuzumab y Pertuzumab.

Las Figuras 8A y 8B muestran las secuencias de aminoácidos de cadena ligera (SEQ ID NO: 13) y cadena pesada (SEQ ID NO: 14) Trastuzumab.

Las Figuras 9A y 9B representan una variante de secuencia de cadena ligera de Pertuzumab (SEQ ID No. 23) y una variante de secuencia de cadena pesada de Pertuzumab (SEQ ID No. 24).

La Figura 10 muestra el diseño experimental para el aislamiento del pico principal (MP) de intercambio catiónico y AV (variantes ácidas), el cultivo celular, recuperación y evaluación y ensayos analíticos de FC (farmacocinética). Medio nuevo = medio estándar; medio usado = medio estándar después de 12 días de cultivo celular, las células se retiraron mediante centrifugación. Oxígeno disuelto, pH y otros parámetros no se sometieron a control.

La Figura 11 muestra un cromatograma típico de intercambio catiónico (CEX) DIONEX PROPAC™ del Ejemplo 1.

La Figura 12 muestra el análisis del material de partida de pertuzumab y fracciones de CEX. AV = variante ácida; MP = pico principal; y BV = variante básica.

La Figura 13 revela el CEX del pico principal (MP) agregado en el medio de cultivo celular e incubado durante 12 días.

La Figura 14 describe las condiciones de incubación del pico principal.

La Figura 15 resume métodos para la caracterización de variante ácidas.

La Figura 16 muestra la concentración de pertuzumab frente al tiempo en estudios de PK en el Ejemplo 1.

La Figura 17 proporciona el área bajo la curva (AUC) y relaciones medias geométricas a partir del estudio de PK en el Ejemplo 1.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

El término "anticuerpo de especie principal" en el presente documento se refiere a la estructura de secuencia de aminoácidos de anticuerpo en una composición que es la molécula de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición. El anticuerpo de especie principal es uno que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada en SEQ ID Nos. 15 y 16 (Pertuzumab).

Un anticuerpo "variante de secuencia de aminoácidos" en el presente documento es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que difiere de un anticuerpo de especie principal. Generalmente, las variantes de secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente un 70 % de homología con el anticuerpo de especie principal y, preferiblemente, tendrán al menos aproximadamente el 80 % y más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 % de homólogos con el anticuerpo de especie principal. Las variantes de secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones y/o adiciones en determinadas posiciones dentro o adyacentes a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de especie principal. Ejemplos de variantes de secuencia de aminoácidos en el presente documento incluyen una variante ácida (por ejemplo, una variante de anticuerpo desamidada), una variante básica, el anticuerpo con una extensión líder aminoterminal (por ejemplo VHS-) en una o dos cadenas ligeras del mismo, anticuerpo con un resto de lisina C-terminal en una o dos cadenas pesadas del mismo, anticuerpo con uno o más restos de metionina oxidada, etc., etc. e incluye combinaciones de variaciones de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y/o ligeras.

Una "variante ácida" es una variante del anticuerpo de especie principal que es más ácida que el anticuerpo de especie principal. Una variante ácida ha ganado carga negativa o ha perdido carga positiva en relación con el anticuerpo de especie principal. Tales variantes ácidas pueden resolverse usando una metodología de separación, tal como cromatografía de intercambio iónico, que separa las proteínas según su carga. Las variantes ácidas de un anticuerpo de especie principal se eluyen más temprano que el pico principal al separarlas mediante cromatografía de intercambio catiónico.

Una "variante reducida por disulfuro" tiene una cisteína(s) unida a disulfuro químicamente reducida a la forma de tiol libre. Esta variante puede controlarse mediante cromatografía de interacción hidrófoba o metodología de calibrado tal como dodecil sulfato sódico-electroforesis de zona capilar con (CE-SDS), por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 1. En el presente documento, una "variante no reducible" es una variante del anticuerpo de especie principal que no puede reducirse químicamente a una cadena pesa y ligera mediante tratamiento con un agente reductor tal como ditioneitol. Tales variantes pueden evaluarse mediante el tratamiento de la composición con un agente reductor y mediante la evaluación de la composición resultante usando una metodología que evalúa el taponamiento de la proteína, tal como la dodecil sulfato sódico-electroforesis de zona capilar (CE-SDS), por ejemplo, usando las técnicas descritas en el Ejemplo 1 a continuación.

Un anticuerpo de "variante de glucosilación" en el presente documento es un anticuerpo con uno o más restos de carbohidratos unidos al mismo que difieren de uno o más restos de carbohidratos unidos a un anticuerpo de especie principal. Los ejemplos de variantes de glucosilación en el presente documento incluyen anticuerpo con una estructura de oligosacáridos G1 o G2, en lugar de una estructura de oligosacárido G0, unida con una región de Fc del mismo, anticuerpo con uno o dos restos de carbohidratos unidos con una o dos cadenas ligeras del mismo, anticuerpo sin carbohidratos unidos a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, anticuerpo que está sialidado, etc., así como combinaciones de dichas alteraciones de glucosilación.

Cuando el anticuerpo tiene una región Fc, una estructura de oligosacárido tal como la que se muestra en la Figura 14 en el presente documento puede estar unida con una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, por ejemplo, en el

resto 299. Para Pertuzumab, G0 fue la estructura del oligosacárido predominante, encontrándose otras estructuras de oligosacáridos tales como GO-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) y G2 en cantidades menores en la composición de Pertuzumab.

- 5 Salvo que se indique de otra manera, una "estructura de oligosacárido G1" en el presente documento incluye estructuras G1(1-6) y G1(1-3).

Para los fines del presente documento, "variante sialidada" es una variante del anticuerpo de especie principal que comprende uno o más restos de carbohidratos sialidados unido a una o dos cadenas pesadas del mismo. Una
10 variante sialidada puede identificarse evaluando una composición (por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico) con o sin tratamiento de sialidasa, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo.

Una "variante glicada" es un anticuerpo al cual se ha unido de forma covalente un azúcar, tal como glucosa. Esta adición puede producirse mediante la reacción de la glucosa con un resto de lisina en la proteína (por ejemplo, en el
15 medio de cultivo celular). Una variante glicada puede identificarse mediante análisis de espectrometría de masas del anticuerpo reducido evaluando el aumento en la masa de las cadenas pesadas o ligeras. Una variante glicada también puede cuantificarse mediante cromatografía de boronato tal como se explica en el Ejemplo 1 a continuación. Una variante glicada difiere de una variante de glicosilación.

20 Un anticuerpo "desamidado" es uno en el que se han derivatizado uno o más restos de asparagina del mismo, por ejemplo, a un ácido aspártico, una succinimida o un ácido iso-aspártico. Un ejemplo de un anticuerpo deamidado es una variante de pertuzumab, en el que Asn-386 y/o Asn-391 en una o dos cadenas pesadas de pertuzumab se deamidan.

25 Una "variante de extensión líder amino-terminal" en el presente documento se refiere a un anticuerpo de especie principal con uno o más restos de aminoácidos de la secuencia líder amino-terminal que están presentes en el extremo amino-terminal de una o más cadenas pesadas o ligeras cualesquiera del anticuerpo de especie principal. Una extensión líder amino-terminal ejemplar comprende o consiste en tres restos de aminoácidos, VHS, presentes en una o ambas cadenas ligeras de una variante de anticuerpo.

30 La "homología" se define como el porcentaje de restos en la variante de secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de homología. Se conocen bien en la técnica métodos y programas informáticos para el alineamiento. Uno de dichos programas informáticos es "Align 2", creado por Genentech, Inc., que se presentó con la documentación de usuario
35 en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

Para los fines del presente documento, "análisis de intercambio catiónico" se refiere a cualquier método por el que una composición que comprende dos o más compuestos se separa basándose en diferencias de carga usando un
40 intercambiador catiónico. Un intercambiador catiónico generalmente comprende grupos con carga negativa, unidos covalentemente. Preferentemente, el intercambiador catiónico en el presente documento es un intercambiador catiónico débil y/o comprende un grupo funcional carboxilato, tal como la columna de intercambio catiónico PROPAC WCX-10™ vendida por Dionex.

Un "receptor HER" es una proteína tirosina quinasa receptora que pertenece a la familia del receptor HER e incluye
45 receptores EGFR, HER2, HER3 y HER4 y otros miembros de esta familia que se identifiquen en el futuro. El receptor HER comprenderá generalmente un dominio extracelular, que puede unirse con un ligando de HER; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo-terminal que alberga varios restos de tirosina que pueden fosforilarse. Preferentemente el receptor HER es un receptor HER humano de secuencia nativa.

50 El dominio extracelular de HER2 comprende cuatro dominios, el Dominio I (restos de aminoácidos de aproximadamente 1-195), Dominio II (restos de aminoácidos de aproximadamente 196-319), Dominio III (restos de aminoácidos de aproximadamente 320-488) y Dominio IV (restos de aminoácidos de aproximadamente 489-630) (numeración de restos sin péptido señal). Véase Garrett y col., Mol. Cell. 11: 495-505 (2003), Cho y col. Nature 421: 756-760 (2003), Franklin y col. Cancer Cell 5: 317-328 (2004) o Plowman y col. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 1746-1750 (1993). Véase, también, la Figura 1 en el presente documento.

Los términos "BrbB1", "HER1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico" y "EGFR" se usan de forma
60 intercambiable en el presente documento y se refieren a EGFR como se desvela, por ejemplo, en Carpenter et col. Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987), incluyendo formas mutantes de origen natural del mismo (por ejemplo un EGFR mutante de delección como en Humphrey y col. PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990)). *erbB1* se refiere al gen que codifica el producto proteico de EGFR.

Las expresiones "ErbB2" y "HER2" se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a
65 proteína de HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba y col., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto y col. Nature 319:230-234 (1986) (número de referencia de Genbank X03363). El término "*erbB2*" se refiere al gen

que codifica ErbB2 humano y "neu" se refiere al gen que codifica p185^{neu} de rata. El HER2 preferente es HER2 humano de secuencia nativa.

"ErbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido receptor como se desvela, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.183.884 y 5.480.968 así como en Kraus et al. PNAS (USA) 86: 9193-9197 (1989).

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

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

"Herregulina" (HRG) cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido codificado por el producto génico de herregulina como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 5.641.869 o Marchionni y col., Nature, 362:312-318 (1993). Los ejemplos de herregulinas incluyen herregulina- α , herregulina- β 1, herregulina- β 2 y herregulina- β 3 (Holmes y col., Science, 256:1205-1210 (1992); y Patente de Estados Unidos N° 5.641.869); factor de diferenciación *neu* (NDF) (Peles y col. Cell 69: 205-216 (1992)); actividad inductora de receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls y col. Cell 72: 801-815 (1993)); factores de crecimiento gliales (GGF) (Marchionni y col., Nature, 362:312-318 (1993)); factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho y col. J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995)); γ -herregulina (Schaefer y col. Oncogene 15: 1385-1394 (1997)). El término incluye fragmentos biológicamente activos y/o variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido de HRG de secuencia nativa, tal como un fragmento de dominio de tipo EGF del mismo (por ejemplo, HRG β ₁₇₇₋₂₄₄).

Un "dímero de HER" en el presente documento es un dímero asociado de forma no covalente que comprende al menos dos receptores HER diferentes. Dichos complejos pueden formarse cuando una célula que expresa dos o más receptores HER se expone a un ligando de HER y puede aislarse por inmunoprecipitación y analizarse por SDS-PAGE como se describe en Sliwkowski y col., J. Biol. Chem., 269(20): 14661-14665 (1994), por ejemplo. Los ejemplos de dichos dímeros de HER incluyen heterodímeros EGFR-HER2, HER2-HER3 y HER3-HER4. Además, el dímero de HER puede comprender dos o más receptores HER2 combinados con un receptor HER diferente, tal como HER3, HER4 o EGFR. Otras proteínas, tales como una subunidad del receptor de citocinas (por ejemplo, gp130) pueden asociarse con el dímero.

Un "sitio de unión heterodimérico" en HER2, se refiere a un región en el dominio extracelular de HER2 que entra en contacto, o forma interfase, con una región en el dominio extracelular de EGFR, HER3 o HER4 tras la formación de un dímero con el mismo. La región se encuentra en el Dominio II de HER2. Franklin y col. Cancer Cell 5: 317-328 (2004).

La "activación de HER" o "activación de HER2" se refiere a la activación, o fosforilación, de uno cualquiera o más receptores HER o receptores HER2. En general, la activación de HER da como resultado la transducción de señal (por ejemplo la provocada por un dominio quinasa intracelular de un receptor HER que fosforila restos de tirosina en el receptor HER o un polipéptido sustrato). La activación de HER puede estar mediada por la unión de un ligando de HER con un dímero de HER que comprende el receptor HER de interés. La unión del ligando de HER con un dímero de HER puede activar un dominio quinasa de uno o más de los receptores HER y por lo tanto da como resultado la fosforilación de restos de tirosina en uno o más de los receptores HER y/o fosforilación de restos de tirosina en un polipéptido o polipéptidos sustrato adicionales, tales como quinasas intracelulares MAPK o Akt.

El término "anticuerpo" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio y específicamente abarca anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados por al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad biológica deseada.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, tales como las variantes descritas en el presente documento. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden realizarse por el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975) o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse también de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el grupo de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, en tanto que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del Viejo Mundo, Simio, etc.) y secuencias de región constante humanas.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo.

Un "anticuerpo intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de la cadena ligera (C_L) y dominios constantes de la cadena pesada, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras y comprende una estructura de oligosacárido unida a una o dos cadenas pesadas del mismo.

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

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina puede variar, la región de cadena pesada de IgG humano normalmente se define que se extiende desde un resto de aminoácido en la posición Cys226 o desde Pro230, al extremo carboxilo del mismo. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante diseño de ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos de K447 retirados, poblaciones sin restos de K447 retirados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

A menos que se indique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU tal como en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración del anticuerpo EU de IgG1 humano.

En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de éstas pueden además dividirse en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales

de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo linfocitos Citolíticos Naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar en la ADCC, células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan, FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa o además, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede determinarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes y col. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose las PBMC y los linfocitos NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo de sangre o PBMC como se describe en el presente documento.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une con la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferente es uno que se une con un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase revisión M. en Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Se revisan FcR en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991); Capel y col., Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)).

La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula para lisar una diana en presencia de un complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) con una molécula (por ejemplo un anticuerpo) en complejo con un antígeno afin. Para evaluar la activación de complemento, puede realizarse un ensayo CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

Los "anticuerpos nativos" son habitualmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera está unida con una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también enlaces disulfuro intracatenarios a espacios regulares. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto a su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan "regiones estructurales" (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración en lámina β, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como participación del

anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

El término "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos de aminoácidos de una región determinante de complementariedad o "CDR" (por ejemplo restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los restos de "región de marco conservado" o "FR" son los restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable como se define en el presente documento.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar con facilidad. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión con antígeno y sigue siendo capaz de reticularse con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . En conjunto, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse con el antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de scFv véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994). Se describen fragmentos scFv de anticuerpo de HER2 en el documento WO93/16185; patente de Estados Unidos n.º 5.571.894; y la Patente de Estados Unidos N.º 5.587.458.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica ($V_H - V_L$). Utilizando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen los diacuerpos más completamente en, por ejemplo, EP 404.097; documento WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden efectuar para perfeccionar adicionalmente el funcionamiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana o todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región

constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

5 Los anticuerpos de HER2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 o Trastuzumab (HERCEPTIN®) como se describe en la Tabla 3 de la Patente de Estados Unidos 5.821.337; 520C9 humanizado (documento WO93/21319) y anticuerpos 2C4 humanizados como se describe en el presente documento.

10 Para los fines del presente documento, "Trastuzumab", "HERCEPTIN®" y "huMAb4D5-8" se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácido de cadena ligera y pesada en SEQ ID NOS. 13 y 14, respectivamente.

15 En el presente documento, "Pertuzumab" y "rhuMAb 2C4", se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácido ligera variable y pesada variable en SEQ ID Nos. 3 y 4, respectivamente. Cuando Pertuzumab es un anticuerpo intacto, comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada en SEQ ID Nos. 15 y 16, respectivamente.

20 Un anticuerpo "desnudo" es un anticuerpo (como se define en el presente documento) que no está conjugado con una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico o radiomarcador.

25 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) en más de un 95 % en peso de anticuerpo, según se determina mediante el método de Lowry y, lo más preferentemente, en más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ en el interior de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

35 Un anticuerpo de HER2 que "inhibe la dimerización de HER más eficazmente que Trastuzumab" es uno que reduce o elimina los dímeros de HER más eficazmente (por ejemplo al menos aproximadamente 2 veces más eficazmente) que Trastuzumab. Preferentemente, dicho anticuerpo inhibe la dimerización de HER2 al menos aproximadamente tan eficazmente como un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal murino intacto 2C4, un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal murino 2C4, Pertuzumab intacto y un fragmento Fab de Pertuzumab. Se puede evaluar la inhibición de la dimerización de HER estudiando los dímeros de HER directamente, o evaluando la activación de HER, o la señalización corriente abajo, que resulta de la dimerización de HER y/o evaluando el sitio de unión de anticuerpo-HER2, etc. Se describen ensayos para cribar con respecto a anticuerpos con la capacidad para inhibir la dimerización de HER más eficazmente que Trastuzumab en Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002) y el documento WO01/00245 (Adams y col.). Únicamente a modo de ejemplo, se puede ensayar con respecto a la inhibición de la dimerización de HER, evaluando, por ejemplo, la inhibición de la formación de dímeros HER (véase, por ejemplo, por ejemplo, Figura 1A-B de Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002); y documento WO01/00245); reducción de la activación del ligando de HER de células que expresan dímeros de HER (documento WO01/00245 y Fig. 2A-B de Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo); bloqueo de la unión del ligando de HER con células que expresan dímeros de HER (documento WO01/00245, y Fig. 2E de Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo); inhibición del crecimiento celular de células cancerosas (por ejemplo, células MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D) que expresan dímeros de HER en presencia (o ausencia) de ligando de HER (documento WO01/00245 y Figs. 3A-D de Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo); inhibición de la señalización corriente abajo (por ejemplo, inhibición de la fosforilación de AKT dependiente de HRG o inhibición de la fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF α) (véase, documento WO01/00245 y Fig. 2C-D de Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo). También se puede evaluar si el anticuerpo inhibe la dimerización de HER estudiando el sitio de unión de anticuerpo-HER2, por ejemplo, evaluando una estructura o modelo, tal como una estructura cristalina, del anticuerpo unido con HER2 (véase, por ejemplo, Franklin y col. *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004)).

60 El anticuerpo de HER2 puede "inhibir la fosforilación de AKT dependiente de HRG" y/o inhibir la "fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF α " más eficazmente (por ejemplo al menos 2 veces más eficazmente) que Trastuzumab (véase Agus y col. *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002) y documento WO01/00245, como ejemplo).

65 El anticuerpo de HER2 puede ser uno que "no inhibe la escisión del ectodominio de HER2" (Molina et al. *Cancer Res.* 61:4744-4749 (2001)).

Un anticuerpo de HER2 que "se une con un sitio de unión heterodimérico" de HER2, se une con restos en el dominio

II (y opcionalmente también se une con restos en otro de los dominios del dominio extracelular de HER2, tales como los dominios I y III) y puede impedir de forma estérica, al menos hasta cierto punto, la formación de un heterodímero de HER2-EGFR, HER2-HER3 o HER2-HER4. Franklin y col. Cancer Cell 5: 317-328 (2004) caracteriza la estructura cristalina de HER2-Pertuzumab, depositada en el Banco de Datos de Proteínas RCSB (ID Código IS78), que ilustra un anticuerpo ejemplar que se une con el sitio de unión heterodimérico de HER2.

Un anticuerpo que "se une con el dominio II" de HER2 se une con restos en el dominio II y opcionalmente restos en otro u otros dominios de HER2, tales como los dominios I y III.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa HER *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor de crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan HER en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueantes de la fase M clásicos incluyen los agentes de la vinca (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topo II, tales como doxorrubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen la G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" de Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la página 13.

Son ejemplos de anticuerpos "inhibidores del crecimiento" los que se unen con HER2 e inhiben el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan HER2. Los anticuerpos de HER2 inhibidores del crecimiento preferentes inhiben el crecimiento de células tumorales de mama SK-BR-3 en cultivo celular en más del 20 %, y preferentemente en más del 50 % (por ejemplo de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 %) a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml, en el que la inhibición del crecimiento se determina seis días después de la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase, Patente de Estados Unidos Nº 5.677.171 presentada el 14 de octubre de 1997). El ensayo de inhibición del crecimiento de células SK-BR-3 se describe en más detalle en esa patente y posteriormente en el presente documento. El anticuerpo inhibidor del crecimiento preferente es una variante humanizada del anticuerpo monoclonal murino 4D5, *por ejemplo*, Trastuzumab.

Un anticuerpo que "induce apoptosis" es uno que induce la muerte celular programada como se determina por la unión de anexina V, fragmentación de ADN, encogimiento celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominados cuerpos apoptóticos). La célula es habitualmente una que sobreexpresa el receptor HER2. Preferentemente la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de mama, ovárica, de estómago, cáncer de endometrio, glándulas salivales, pulmón, el riñón, de colon, de tiroides, pancreática o de vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, célula Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. Están disponibles diversos métodos para evaluar los acontecimientos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de fosfatidil serina (PS) puede medirse por unión de anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse mediante comparación con marcadores de ADN; y la condensación nuclear/de cromatina junto con fragmentación a lo largo del ADN puede evaluarse por cualquier aumento en células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es uno que da como resultado aproximadamente 2 a 50 veces, preferentemente de aproximadamente 5 a 50 veces, y más preferentemente de aproximadamente 10 a 50 veces, inducción de unión de anexina en relación con la célula no tratada en un ensayo de unión de anexina usando células BT474 (véase posteriormente). Los ejemplos de anticuerpos de HER2 que inducen la apoptosis son 7C2 y 7F3.

El "epítipo 2C4" es la región del dominio extracelular de HER2 con la que se une el anticuerpo 2C4. Para cribar con respecto a anticuerpos que se unen con el epítipo 2C4, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse mapeo de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une con el epítipo 2C4 de HER2 usando métodos conocidos en la técnica y/o se puede estudiar la estructura de anticuerpoHER2 (Franklin y col. Cancer Cell 5: 317-328 (2004)) para ver qué dominio o dominios de HER2 se unen con el anticuerpo. El epítipo 2C4 comprende restos del dominio II en el dominio extracelular de HER2. 2C4 y Pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en el punto de unión de los dominios I, II y III. Franklin y col. Cancer Cell 5: 317-328 (2004).

El "epítipo 4D5" es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y Trastuzumab. Este epítipo está cerca del dominio transmembrana de HER2, y dentro del Dominio IV de HER2. Para cribar con respecto a anticuerpos que se unen con el epítipo 4D5, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse mapeo de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une con el epítipo 4D5 de HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más restos en la región de aproximadamente el resto 529 a aproximadamente el resto 625, ambos incluidos, en la Fig. 1).

El "epítipo 7C2/7F3" es la región en el extremo N terminal, dentro del Dominio I, del dominio extracelular de HER2 con el que se unen los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (cada uno depositado en la ATCC, véase posteriormente). Para cribar con respecto a anticuerpos que se unen con el epítipo 7C2/ 7F3, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse mapeo de epítipos para establecer si el anticuerpo se une con el epítipo 7C2/7F3 en el HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más de los restos en la región de aproximadamente el resto 22 a aproximadamente el resto 53 de HER2 en la Fig. 1).

"Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que necesiten tratamiento incluyen los que ya tienen la enfermedad así como en los que va a prevenirse la enfermedad. Por tanto, el paciente a tratar en el presente documento puede haberse diagnosticado que tiene la enfermedad o puede estar predispuesto o ser susceptible a la enfermedad.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma "incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma y cáncer de células de islotes), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, cáncer de testículos, cáncer esofágico, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar la enfermedad en el paciente. Cuando la enfermedad es cáncer, la cantidad eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad eficaz puede extender la supervivencia sin progresión, dar como resultado una respuesta objetiva (incluyendo una respuesta parcial, PR, o respuesta completa, CR), aumentar el tiempo de supervivencia total y/o mejorar uno o más síntomas de cáncer.

Un "cáncer que expresa HER2" es uno que comprende células que tienen la proteína HER2 presente en su superficie celular.

Un cáncer que "sobreexpresa" un receptor HER es uno que tiene niveles significativamente mayores de un receptor HER, tal como HER2, en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular. Dicha sobreexpresión puede estar provocada por la amplificación génica o por transcripción o translación aumentadas. La sobreexpresión del receptor HER puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles aumentados de la proteína HER presente en la superficie de una célula (por ejemplo mediante un ensayo inmunohistoquímico; IHC). Como alternativa o además, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica HER en la célula, por ejemplo mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH; véase documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia de Southern o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión de receptor HER midiendo el antígeno desprendido (por ejemplo, dominio extracelular de HER) en un fluido biológico tal como suero (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 4.933.294 presentada el 12 de junio de 1990; documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991; Patente de Estados Unidos 5.401.638 presentada el 28 de marzo de 1995; y Sias y col. J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, están disponibles para los expertos en la materia diversos ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está marcado opcionalmente con un marcador detectable, por ejemplo un isótopo radioactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo con células en el paciente, por ejemplo, mediante cribado externo por radioactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Por el contrario, un cáncer que "no sobreexpresa el receptor HER2" es uno que no expresa niveles mayores de lo normal de receptor de HER2 en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular.

Un cáncer que "sobreexpresa" un ligando de HER es uno que produce niveles significativamente mayores de ese ligando en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular. Dicha sobreexpresión puede estar provocada por la amplificación génica o por transcripción o translación aumentadas. La sobreexpresión del ligando

de HER puede determinarse de forma diagnóstica evaluando los niveles del ligando (o ácido nucleico que lo codifica) en el paciente, por ejemplo, en una biopsia tumoral o por diversos ensayos de diagnóstico tales como los ensayos IHC, FISH, transferencia de Southern, PCR o ensayos *in vivo* descritos anteriormente.

La expresión "agente citotóxico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. Con el término se pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CITOXAN®); alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina incluyendo el análogo sintético de topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escoplectina y 9-aminocamptotecina; briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omega1 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos y antibióticos cromóforos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolinodoxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposoma de doxorubicina HCl (DOXIL®), doxorubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposómica pegilada (CAELYX®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, enocitabina, floxuridina; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaciquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinán; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazuquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, *por ejemplo*, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas obtenidas por ingeniería de albúminas de paclitaxel (ABRAXANE™) y docetaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vincas, que evitan que la polimerización de tubulina forme microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, incluyendo bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente, los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosoma (por ejemplo PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase definición posterior); inhibidores de tirosina quinasa (véase definición a continuación); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de

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

- 5 También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como anti-estrógenos con mezcla de perfil agonista/antagonista, incluyendo, incluyendo, tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, keoxifeno, y modulares del receptor de estrógeno selectivos (SERM) tales como SERM3; anti-estrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®) y EM800 (dichos agentes
10 pueden bloquear la dimerización del receptor de estrógenos (ER), inhibir la unión de ADN, aumentar la renovación de ER y/o suprimir los niveles de ER); inhibidores de la aromatasa, incluyendo inhibidores de aromatasa esteroideos tales como formestano y exemestano (AROMASIN®), e inhibidores de aromatasa no esteroideos tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de aromatasa incluyendo vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol, imidazol; agonistas de la hormona liberadora de
15 hormona luteinizante, incluyendo leuprolide (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, busserelina y tripterelina; esteroides sexuales, incluyendo progestinas tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilestilbestrol y premarina, y andrógenos/retinoides tales fluoximesterona, todo ácido trans-retinóico y fenretinida; onapristona; anti-progesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; testolactona; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

- Tal como se usa en el presente documento, "fármaco dirigido a EGFR" se refiere a un agente terapéutico que se une con EGFR y, opcionalmente, inhibe la activación de EGFR. Los ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y
25 moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen con EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, Patente de Estados Unidos N° 4.943.533, Mendelsohn y col.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano remodelado (H225) (véase, documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo dirigido a EGFR completamente humano (Imclone); anticuerpos que se unen con EGFR mutante de tipo II (Patente de Estados Unidos N° 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen con EGFR como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen con EGFR, tales como ABX-EGF o Panitumumab (véase documento WO98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto y col. Eur. J. Cancer 32A: 636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo de EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compete tanto con EGF como con TGF-alfa por la unión
35 con EGFR (EMD/Merck); anticuerpo de EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticuerpos completamente humanos conocidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 y E7.6.3 y descritos en el documento US 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc); y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns y col., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico, generando de este modo un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, por ejemplo, documento EP659.439A2, Patente de Merck GmbH). Los antagonistas de EGFR incluyen moléculas pequeñas tales como compuestos descritos en las Patentes de Estados Unidos N°: 5.616.582, 5.457.105, 5.475.001, 5.654.307, 5.679.683, 6.084.095, 6.265.410, 6.455.534, 6.521.620, 6.596.726, 6.713.484, 5.770.599, 6.140.332, 5.866.572, 6.399.602, 6.344.459, 6.602.863, 6.391.874, 6.344.455, 5.760.041, 6.002.008 y 5.747.498, así como las siguientes publicaciones de PCT: WO98/14451, WO98/50038, WO99/09016 y WO99/24037. Las moléculas pequeñas antagonistas de EGFR particulares incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3 (4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-, diclorhidrato, Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA®) 4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolina, Astra-Zeneca; ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidin-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4 [(1-feniletíl)amino]-1H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4 [(1-feniletíl)amino]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butanamida); EKB-569 (N-[4 [(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4 (dimetilamino)-2-butanamida) (Wiet); AG1478 (Sugen); AG1571 (SU 5271; Sugén); inhibidores de tirosina quinasa EGFR/HER2 dobles tales como lapatinib (GW 572016 o N-[3-cloro-4-[(3 fluorofenil)metoxi]fenil]6[5[[[2metilsulfonil]etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina Glaxo-SmitKline) o derivados
55 de cianoguanidín quinazolina y cianoamidín quinazolinamina.

- Un "inhibidor de tirosina quinasa" es una molécula que inhibe la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa tal como un receptor HER. Los ejemplos de dichos inhibidores incluyen los fármacos dirigidos a EGFR observados en el párrafo anterior; molécula pequeña inhibidora de tirosina quinasa HER2 tal como TAK165 disponible de Takeda; CP-724.714, un inhibidor selectivo oral del receptor tirosina quinasa ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores de HER dobles tales como EKB-569 (disponible de Wyeth) que se une preferentemente con EGFR pero inhibe células que sobreexpresan tanto HER2 como EGFR; lapatinib (GW572016; disponible de Glaxo-SmithKline) un inhibidor de tirosina quinasa HER2 y EGFR oral; PKI-166 (disponible de Novartis); inhibidores pan-HER tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1 tales como agente antisentido ISIS-5132 disponible de ISIS Pharmaceuticals que inhibe la señalización de Raf-1; inhibidores de TK no dirigidos a HER tales como Imatinib mesilato (GLEEVEC) disponibles de Glaxo; inhibidor de quinasa I regulada extracelular MAPK CI-1040 (disponible
65

de Pharmacia); quinazolininas, tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d] pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen restos de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por ejemplo las que se unen con ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (Patente de Estados Unidos N° 5.804.396); trifostinas (Patente de Estados Unidos N° 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-HER tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); Imatinib mesilato (Gleevec; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); derivados de cianoguanidín quinazolina y cianoamidín quinazolamina; o como se ha descrito en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: Patente de Estados Unidos N° 5.804.396; documentos WO99/09016 (American Cyanamid); WO98/43960 (American Cyanamid); WO97/38983 (Warner Lambert); WO99/06378 (Warner Lambert); WO99/06396 (Warner Lambert); WO96/30347 (Pfizer, Inc); WO96/33978 (Zeneca); WO96/3397 (Zeneca); WO96/33980 (Zeneca); y US2005/0101617.

Un "agente anti-angiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado con el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico puede, por ejemplo, ser una molécula pequeña o anticuerpo que se une con un factor de crecimiento o receptor de factor de crecimiento implicado en la promoción de angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferente en el presente documento es un anticuerpo que se une al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), tal como Bevacizumab (AVASTIN®).

El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas del crecimiento, tal como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana con N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelinaxina; hormonas glicoproteicas, tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factores α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora de mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento neural, tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF), tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón- α , - β y - γ ; factores estimulantes de colonias (CSF), tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL), tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando de kit (KL). Tal como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

II. Composiciones de variantes de anticuerpo de HER2

La presente invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo de HER2 de especie principal que comprende secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada en SEQ ID NOs. 15 y 16 respectivamente y que se une al dominio II de HER2 y variantes ácidas de ese anticuerpo de especie principal, en el que el anticuerpo de HER2 de especie principal es la estructura de secuencia de aminoácidos de anticuerpo que es la moléculas de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición y el anticuerpo de HER2 de especie principal y las variantes ácidas son todos anticuerpos intactos, en las que las variantes ácidas incluyen una variante reducida por disulfuro y/o una variante no reducible.

La composición en el presente documento comprende un anticuerpo de HER2 de especie principal que se une al dominio II de HER2 y variante ácidas del mismo en las que las variantes ácidas incluyen una, dos o tres de variante glicada, variante reducida por disulfuro o variante no reducida. Las variantes ácidas en la composición pueden incluir una, dos, tres, cuatro o cinco de variante glicada, variante deamidada, variante reducida por disulfuro, variante sialilada o variante no reducida. Preferentemente, la cantidad total de todas las variantes ácidas en la composición es menor de aproximadamente 25 %. En una realización, la variante glicada, variante deamidada, variante reducida por disulfuro, variante sialilada o variante no reducida constituye al menos aproximadamente el 75-80 % de las variantes ácidas en la composición.

La invención proporciona un método para preparar una composición farmacéutica que comprende: (1) preparar una composición que comprende un anticuerpo de HER2 de especie principal que comprende secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada en SEQ ID NOs. 15 y 16 respectivamente y que se une al dominio II de HER2 y variantes ácidas de ese anticuerpo de HER2 de especie principal incluyendo una variante reducida por disulfuro y/o una variante no reducible, en el que el anticuerpo de HER2 de especie principal es la estructura de secuencia de aminoácidos de anticuerpo que es la moléculas de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición y el anticuerpo de HER2 de especie principal y las variantes ácidas son todos anticuerpos intactos y (2) evaluar las variantes ácidas en la composición y confirmar que la cantidad de las mismas es inferior a

aproximadamente el 25 %.

El método contempla combinar la composición antes, durante o después de la etapa (2) con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición evaluada en la etapa (2) es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, al menos aproximadamente el 75-80 % de las variantes ácidas (que constituyen menos de aproximadamente el 25 % de la composición) se seleccionan de: variante glicada, variante deamidada, variante reducida por disulfuro, variante sialilada o variante no reducida.

Las variantes ácidas pueden evaluarse mediante diversos métodos, pero preferentemente tales métodos incluyen uno, dos, tres, cuatro o cinco de: cromatografía de intercambio iónico (IEC) en la que la composición se trata con sialidasa antes, después y /o durante la IEC (por ejemplo, para evaluar la variante sialilada), CE-SDS reducida (por ejemplo, para evaluar la variante reducida por disulfuro), CE-SDS no reducida (por ejemplo, para evaluar la variante no reducible), cromatografía de boronato (por ejemplo, para evaluar la variante glicada) y mapeo peptídico (por ejemplo, para evaluar la variante deamidada).

En una realización, las variantes ácidas totales se evalúan mediante cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo usando un intercambiador catiónico débil y/o intercambiador catiónico con grupo funcional carboxilato (por ejemplo, usando una columna de cromatografía DIONEX PROPAC™ WCX-10). En una realización de tal cromatografía las condiciones para la cromatografía implican Tampón A de 20 mM de BisTris, pH 6,0; Tampón B de 20 mM de BisTris, NaCl 200 mM, pH 6,0; y un gradiente de 0,5 % de Tampón B a 1,0 ml/min.

La composición incluye, opcionalmente, una variante de extensión líder amino-terminal. Preferentemente, la extensión líder amino-terminal se encuentra en una cadena ligera de la variante de anticuerpo (por ejemplo, en una o dos cadenas ligeras de la variante de anticuerpo). El anticuerpo de HER2 de especie principal o la variante de anticuerpo puede ser un anticuerpo intacto o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos Fab de F(ab')₂), pero preferentemente los dos son anticuerpos intactos. La variante de anticuerpo del presente documento puede comprender una extensión líder amino-terminal en cualquiera una o más de las cadenas pesadas o ligeras de la misma. Preferentemente, la extensión líder amino-terminal se encuentra en una o dos cadenas ligeras del anticuerpo. La extensión líder amino-terminal preferentemente comprende o consiste en VHS-. La presencia de la extensión líder amino-terminal en la composición puede detectarse mediante diversas técnicas analíticas que incluyen, pero sin limitación, análisis de secuencia N-terminal, ensayo para heterogeneidad de carga (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis de zona capilar), espectrometría de masas, etc. La cantidad de la variante de anticuerpo en la composición generalmente varía desde una cantidad que constituye el límite de detección mínimo en cualquier ensayo (preferentemente análisis de intercambio catiónico) usado para detectar la variante en una cantidad inferior que la cantidad del anticuerpo de especie principal. En general, aproximadamente el 20 % o menos (por ejemplo, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 15 %, por ejemplo, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 % y preferentemente de aproximadamente 8 % a aproximadamente 12 %) de las moléculas de anticuerpo en la composición comprenden una extensión líder amino-terminal. Tales cantidades de porcentaje se determinan preferentemente usando análisis de intercambio catiónico.

Se contemplan alteraciones de secuencia de aminoácidos adicionales del anticuerpo de especie principal y/o variante, incluyendo pero sin limitación un anticuerpo que comprende un resto de lisina C-terminal en una o ambas cadenas pesadas del mismo (tal variante de anticuerpo puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 20 %), anticuerpo con uno o más restos de metionina oxidados (por ejemplo, Pertuzumab que comprende met-254 oxidado), etc.

Además, aparte de la variante sialilada comentada anteriormente, la especie principal del anticuerpo o variante puede comprender adicionalmente variaciones de glucosilación, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen anticuerpo que comprende una estructura de oligosacárido G1 o G2 unida con la región Fc del mismo, el anticuerpo que comprende un resto de carbohidrato unido con una cadena ligera del mismo (por ejemplo, uno o dos restos de carbohidratos, tales como glucosa o galactosa, unidos a una o dos cadenas ligeras del anticuerpo, por ejemplo unidos a uno o más restos de lisina), el anticuerpo que comprende una o dos cadenas pesadas no glucosiladas, etc.

La composición puede recuperarse de una línea celular modificada por ingeniería genética, por ejemplo, una línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que expresa el anticuerpo de HER2 o puede prepararse por síntesis peptídica.

III. Producción de anticuerpos de HER2

A continuación hay una descripción con respecto a técnicas ejemplares para la producción de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención. El antígeno de HER2 a usar para producción de anticuerpos puede ser, *por ejemplo*, una forma soluble del dominio extracelular de HER2 o una parte del mismo, que contiene el epítipo deseado. Como alternativa, pueden usarse células que expresan HER2 en su superficie celular (por ejemplo células NIH-3T3 transformadas para sobreexpresar HER2; o una línea celular de carcinoma tal como células SK-BR3, véase

Stancovski y col. PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991)) para generar anticuerpos. Otras formas de HER2 útiles para generar anticuerpos resultarán evidentes para los expertos en la materia.

(i) *Anticuerpos monoclonales*

Se obtienen anticuerpos monoclonales a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, tales como las variantes descritas en el presente documento. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica que la naturaleza del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos pequeños.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567).

En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, como se ha descrito anteriormente en el presente documento para activar a los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después se fusionan linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Son células de mieloma preferentes las que se fusionan eficazmente, apoyan la producción estable de altos niveles del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como un medio HAT. Entre estas, son líneas celulares de mieloma preferentes las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Centro de Distribución Celular del Instituto Salk, San Diego, California, Estados Unidos y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland, Estados Unidos. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); y Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y col., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución límite y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de líquido ascítico en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan convenientemente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencía usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo incluyen Skerra y col., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256-262 (1993) y Plückerthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpo generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las publicaciones

posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por barajado de cadenas (Marks y col., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera humana en el lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:6851 (1984)), o mediante la unión covalente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no inmunoglobulina.

(ii) Anticuerpos humanizados

Se han descrito en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), las secuencias de región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) en la que donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y, posiblemente algunos restos de la FR, están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se examina respecto toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como la región de marco conservado humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia y col., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región de marco concreta derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de cadenas ligera o pesada. La misma estructura se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen con la retención de una afinidad elevada para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferente, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles habitualmente y son familiares para aquellos expertos en la materia. Se dispone de programas de ordenador que ilustran y exponen posibles estructuras conformacionales en tridimensionales de secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidata. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de modo que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente, y más sustancialmente, implicados en la influencia de la unión a antígeno.

La Patente de Estados Unidos N.º 6.949.245 describe la producción de anticuerpos de HER2 humanizados ejemplares que se unen con HER2 y bloquean la activación del ligando de un receptor HER. El anticuerpo humanizado de interés particular en el presente documento bloquea la activación mediada por EGF, TGF- α y/o HRG de MAPK esencialmente tan eficazmente como el anticuerpo monoclonal murino intacto 2C4 (o un fragmento Fab del mismo) y/o se une con HER2 esencialmente tan eficazmente como el anticuerpo monoclonal murino intacto 2C4

(o un fragmento Fab del mismo). El anticuerpo humanizado en el presente documento puede, por ejemplo, comprender restos de región hipervariable no humana incorporados en un dominio pesado variable humano y pueden comprender además una sustitución de región de marco conservado (FR) en una posición seleccionada del grupo que consiste en 69H, 71H y 73H utilizando el sistema de numeración de dominio variable expuesto en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). En una realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de FR en dos o todas las posiciones 69H, 71H y 73H.

Un anticuerpo humanizado ejemplar de interés en el presente documento comprende restos determinantes de complementariedad pesados variables GFTFTDYTMX, en los que X es preferentemente D o S (SEQ ID NO:7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO:8); y/o NLGPSFYFDY (SEQ ID NO:9), que comprende opcionalmente modificaciones de aminoácidos de esos restos de CDR, por ejemplo en los que las modificaciones esencialmente mantienen o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o de aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR pesadas variables anteriores. Tales variantes de anticuerpo pueden prepararse por maduración de afinidad, *por ejemplo*, como se describe más adelante. El anticuerpo humanizado más preferente comprende la secuencia de aminoácidos pesada variable en SEQ ID NO:4.

El anticuerpo humanizado puede comprender restos determinantes de complementariedad ligeros variables KASQDVSIGVA (SEQ ID NO:10); SASYX¹X²X³, en la que X¹ es preferentemente R o L, X² es preferentemente Y o E, y X³ es preferentemente T o S (SEQ ID NO:11); y/o QQYYIYPYT (SEQ ID NO:12), por ejemplo además de los restos de CDR de dominio variable pesado en el párrafo anterior. Tales anticuerpos humanizados comprenden opcionalmente modificaciones de aminoácidos de los restos CDR anteriores, por ejemplo en los que las modificaciones esencialmente mantienen o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o de aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR ligeras variables anteriores. Tales variantes de anticuerpo pueden prepararse por maduración de afinidad, *por ejemplo*, como se describe más adelante. El anticuerpo humanizado más preferente comprende la secuencia de aminoácidos ligera variable en SEQ ID NO:3.

La presente solicitud también contempla anticuerpos madurados por afinidad que se unen con HER2 y bloquea la activación del ligando de un receptor HER. El anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, *por ejemplo*, uno que comprende las secuencias ligera variable y/o pesada variable de SEQ ID Nos. 3 y 4, respectivamente (es decir variante 574). El anticuerpo madurado para afinidad preferentemente se une con el receptor HER2 con una afinidad superior a la del 2C4 murino intacto o 574 variante intacto (por ejemplo afinidad mejorada de aproximadamente dos o aproximadamente cuatro veces a aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1000 veces, por ejemplo, como se evalúa usando un ELISA de dominio extracelular de HER2 (ECD)). Los restos de CDR variables pesadas ejemplares para sustitución incluyen H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99 o combinaciones de dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de estos restos). Los ejemplos de restos de CDR variables ligeras para alteración incluyen L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 o combinaciones de dos o más (por ejemplo, de dos a tres, cuatro, cuatro, cinco o hasta aproximadamente diez de estos restos).

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está opcionalmente conjugado con uno o más agente(s) citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Como alternativa, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

(iii) Anticuerpos humanos

Como una alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal tendrá como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, *por ejemplo*, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y Patentes de Estados Unidos Nos. 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

Como alternativa, puede usarse tecnología de presentación de fagos (McCafferty y col., *Nature* 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina (V) de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en el marco de un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido

a que la partícula filamentosas contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación de fagos puede realizarse en diversos formatos; para su revisión véase, *por ejemplo*, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para presentación de fagos. Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991) aislaron una serie de diversos anticuerpos anti-oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes no inmunizados humanos y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo auto antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Marks y col., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12: 725-734 (1993). Véase, también, las Patentes de Estados Unidos N° 5.565.332 y 5.573.905.

También pueden generarse anticuerpos humanos por linfocitos B activados *in vitro* (véase Patentes de Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

Se describen anticuerpos de HER2 humanos en la Patente de Estados Unidos N° 5.772.997 presentada el 30 de junio de 1998 y el documento WO 97/00271 publicado el 3 de enero de 1997.

(iv) Fragmentos de anticuerpo

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, *por ejemplo*, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); y Brennan y col., Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpo analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse directamente fragmentos F(ab')₂ de cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv de cadena simple (scFv). Véase el documento WO 93/16185; patente de Estados Unidos n.º 5.571.894; y la Patente de Estados Unidos N.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", *por ejemplo*, como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.641.870, *por ejemplo*. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(v) Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse con dos epítopos diferentes de la proteína de HER2. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a HER2 con un sitio o sitios de unión para EGFR, HER3 y/o HER4. Como alternativa, puede combinarse una rama de HER2 con una rama que se une con una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula de receptor de linfocitos T (por ejemplo CD2 o CD3) o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular a la célula que expresa HER2. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan HER2. Estos anticuerpos poseen una rama de unión a HER2 y una rama que se une con el agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloides de la vinca, la cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos de F(ab')₂).

El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico de HER2/FcγRIII y la Patente de Estados Unidos N° 5.837.234 desvela un anticuerpo biespecífico de HER2/FcγRI IDM1 (Osidem). Se muestra un anticuerpo biespecífico de HER2/Fcα en el documento WO98/02463. La Patente de Estados Unidos N° 5.821.337 enseña un anticuerpo biespecífico de HER2/CD3. MDX-210 es un Ab biespecífico de HER2-FcγRIII.

Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión simultánea de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de la inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein y co., Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es demasiado complicada y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares están descritos en el documento WO 93/08829 y en Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión

deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos una parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión con la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan simultáneamente en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no son de significancia particular.

En una realización preferente de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están ompuestos por una cadena pesada de la inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO/94/04690. Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos, véanse, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferente comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera moléculas de anticuerpo son sustituidas por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos "heteroconjugados" o reticulados. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Se ha propuesto, por ejemplo, que dichos anticuerpos para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la materia y se divulgan en la patente de Estados Unidos n.º. 4,676,980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que puede estar químicamente acoplado para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de F(ab')₂ de aticuerpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento Fab' fue secretado por separado de *E. coli* y sometido a acoplamiento químico dirigido in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor HER2 y las linfocitos T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos de tumores de mama humanos.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los anticuerpos homodiméricos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos

biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

(vi) Otras modificaciones secuencia de aminoácidos

Se contemplan la modificación o modificaciones de los anticuerpos de HER2 descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo de HER2 introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico de anticuerpo de HER2 o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo HER2. Cualquier combinación de deleción, inserción, y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos pueden alterar también los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo HER2, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Un procedimiento útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo HER2 que son ubicaciones preferentes para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" como se describe en Cunningham y Wells Science, 244:1081-1085 (1989). En el presente caso, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyeron por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferente alanina o polialanina) que influye sobre la interacción de los aminoácidos con el antígeno HER2. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque se predetermine el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita determinarse. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se llevó a cabo el barrido de Ala o la mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes de anticuerpos de HER2 expresadas se seleccionaron para la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo-terminales que varían en cuanto a su longitud desde un resto hasta polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de uno solo o múltiples restos de aminoácido. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo HER2 con un resto metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo de HER2 incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo de HER2 a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto aminoácido en la molécula del anticuerpo de HER2 sustituido por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables o CDR, pero también se contemplan alteraciones de FR o región Fc. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones preferentes". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe además posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y cribarse los productos.

Tabla 1

Resto original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg

He (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento (a) de la estructura del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., págs. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Como alternativa, Los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen sobre la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo de HER2 también puede sustituirse, en general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el reticulado aberrante. Por el contrario, pueden añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particular preferente de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo un anticuerpo humano o humanizado). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo precursor a partir del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad utilizando una biblioteca de expresión en fagos. Brevemente, varios sitios en la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) están mutados para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpos generadas de esta manera se expresan de manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto génico III del paquete M13 en cada partícula. Las variantes expresadas en fagos se seleccionan a continuación para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. A fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede llevar a cabo la mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. Como alternativa o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el HER2 humano. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se ha descrito en el presente documento y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por

alteración se entiende la delección de uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de anticuerpos es normalmente una unión al átomo de N o una unión al átomo de O. La unión al átomo de N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glucosilación unida al átomo de O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unida al átomo de N). La alteración puede realizarse también mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse cualquier estructura de oligosacárido unida al mismo. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos US 2003/0157108 A1, Presta, Véase también el documento US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se hace referencia a anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) en la bisectriz de la estructura de oligosacáridos unida a una región Fc del anticuerpo en el documento WO03/011878, Jean-Mairet y col. y la patente de Estados Unidos n.º 6.602.684, Umana y col. Se presentan anticuerpos con al menos un resto de galactosa en una estructura de oligosacárido unida con una región Fc del anticuerpo en el documento WO97/30087, Patel et al. Véase, también, documentos WO98/58964 (Raju, S.) y WO99/22764 (Raju, S.) con respecto a anticuerpos con carbohidratos alterados unidos con la región Fc de los mismos. Se contemplan en el presente documento composiciones de anticuerpo que comprenden la especie principal del anticuerpo con dichas estructuras de carbohidratos unidas a una o dos cadenas pesadas de la región Fc.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo de HER2 se preparan mediante diversos procedimientos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagénesis mediante PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada inicialmente o una versión no variante del anticuerpo de HER2.

(vii) Cribado con respecto a anticuerpos con las propiedades deseadas

Se han descrito anteriormente técnicas para generar anticuerpos. Se pueden seleccionar adicionalmente anticuerpos con ciertas características biológicas, según se desee.

Para identificar un anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER, puede determinarse la capacidad del anticuerpo para bloquear la unión del ligando de HER con células que expresan el receptor HER (por ejemplo, conjugación con otro receptor HER con el que el receptor HER de interés forma un hetero-oligómero de HER). Por ejemplo, pueden incubarse células que expresan de forma natural o se transfectan para expresar, receptores HER del hetero-oligómero de HER con el anticuerpo y después exponerse al ligando de HER marcado. La capacidad del anticuerpo de HER2 para bloquear la unión del ligando con el receptor HER en el hetero-oligómero de HER puede evaluarse después.

Por ejemplo, puede realizarse inhibición de la unión de HRG con líneas celulares de tumor de mama MCF7 por anticuerpos de HER2 usando cultivos de MCF7 en monocapa en hielo en un formato de placa de 24 pocillos esencialmente como se ha descrito en el documento WO01/00245. Pueden añadirse entonces anticuerpos monoclonales de HER2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos. Puede añadirse entonces rHRG β ₁₁₇₇₋₂₂₄ marcado con ¹²⁵I (25 pm), y la incubación puede continuarse durante 4 a 16 horas. Pueden prepararse curvas de respuesta a dosis y puede calcularse un valor de CI₅₀ para el anticuerpo de interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá un CI₅₀ para inhibir la unión de HRG con células MCF7 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la CI₅₀ para inhibir la unión de HRG con células MCF7 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menos, más preferentemente 50 nM o menos.

Como alternativa o además, la capacidad del anticuerpo de HER2 para bloquear la fosforilación de tirosina estimulada por ligando de HER de un receptor HER presente en un hetero-oligómero de HER puede evaluarse. Por ejemplo, pueden incubarse células que expresan de forma endógena los receptores HER o transfectadas para

expresarlos con el anticuerpo y después ensayarse con respecto a actividad de fosforilación de tirosina dependiente de ligando de HER usando un anticuerpo monoclonal antifosfotirosina (que está conjugado opcionalmente con un marcador detectable). El ensayo de activación del receptor quinasa descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 5.766.863 también está disponible para determinar la activación del receptor HER y el bloqueo de esa actividad por un anticuerpo.

En una realización, se puede cribar con respecto a un anticuerpo que inhiba la estimulación de HRG de fosforilación de tirosina en p180 en células MC7 esencialmente como se describe en el documento WO01/00245. Por ejemplo, las células MCF7 pueden sembrarse en placas de 24 pocillos y pueden añadirse anticuerpos monoclonales a HER2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente; después puede añadirse rHRG β ₁₇₇₋₂₄₄ a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM, y la incubación puede continuarse durante 8 minutos. Los medios pueden aspirarse de cada pocillo, y las reacciones pueden detenerse mediante la adición de 100 μ l de tampón de muestra de SDS (SDS 5 %, DTT 25 mM; y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25 μ l) puede someterse a electroforesis en un gel de gradiente de 4-12 % (Novex) y después transferirse electroforéticamente a membrana de difluoruro de polivinilideno. Pueden revelarse inmunotransferencias antifosfotirosina (a 1 μ g/ml), y puede cuantificarse la intensidad de la banda reactiva predominante a Mr $\approx$ 180.000 mediante densitometría de reflectancia. El anticuerpo seleccionado inhibirá preferentemente de forma significativa la estimulación de HRG de fosforilación de tirosina en p180 a aproximadamente 0-35 % de control en este ensayo. Puede prepararse una curva de respuesta a dosis para la inhibición de estimulación de HRG de fosforilación de tirosina de p180 como se determina por densitometría de reflectancia y puede calcularse una CI₅₀ para el anticuerpo de interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá una CI₅₀ para inhibir la estimulación de HRG de fosforilación de tirosina en p180 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la CI₅₀ para inhibir la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina en p180 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menos, más preferentemente 50 nM o menos.

También se puede evaluar los efectos inhibidores en el crecimiento del anticuerpo en células MDA-MB-175, *por ejemplo*, esencialmente como se describe en Schaefer et al. Oncogene 15: 1385-1394 (1997). De acuerdo con este ensayo, las células MDA-MB-175 pueden tratarse con un anticuerpo monoclonal de HER2 (10 μ g/ml) durante 4 días y teñirse con cristal violeta. La incubación con un anticuerpo de HER2 puede mostrar un efecto inhibidor de crecimiento en esta línea celular similar al presentado por el anticuerpo monoclonal 2C4. En una realización adicional, la HRG exógena puede no invertir significativamente esta inhibición. Preferentemente, el anticuerpo será capaz de inhibir la proliferación celular de células MDA-MB-175 en un mayor grado que el anticuerpo monoclonal 4D5 (y opcionalmente en un mayor grado que el anticuerpo monoclonal 7F3), tanto en presencia como en ausencia de HRG exógena.

En una realización, El anticuerpo de HER2 de interés puede bloquear la asociación dependiente de herregulina de HER2 con HER3 tanto en células MCF7 como SK-BR-3 como se determina en un experimento de co-inmunoprecipitación tal como el descrito en el documento WO01/00245 de forma sustancialmente más eficaz que el anticuerpo monoclonal 4D5, y preferentemente de forma sustancialmente más eficaz que el anticuerpo monoclonal 7F3.

Para identificar anticuerpos de HER2 inhibidores del crecimiento, se puede cribar con respecto a anticuerpos que inhiben el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan HER2. En una realización, el anticuerpo inhibidor del crecimiento elegido es capaz de inhibir el crecimiento de células SK-BR-3 en cultivo celular en aproximadamente el 20-100 % y preferentemente en aproximadamente 50-100 % a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 μ g/ml. Para identificar tales anticuerpos, puede realizarse el ensayo de SK-BR-3 descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 5.677.171. De acuerdo con este ensayo, las células SK-BR-3 se cultivan en una mezcla 1:1 de F12 y medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina y penicilina estreptomycin. Las células SK-BR-3 se siembran a 20.000 células en una placa de cultivo celular de 35 mm (2 ml/placa de 35 mm). Se añaden de 0,5 a 30 μ g/ml del anticuerpo de HER2 por placa. Después de seis días, se cuenta el número de células, en comparación con las células no tratadas, usando un contador celular electrónico COULTER™. Los anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SK-BR-3 en aproximadamente 20-100 % o aproximadamente 50-100 % pueden seleccionarse como anticuerpos inhibidores del crecimiento. Véase Patente de Estados Unidos Nº 5.677.171 para ensayos para cribar con respecto a anticuerpos inhibidores del crecimiento, tales como 4D5 y 3E8.

Para seleccionar los anticuerpos que inducen la apoptosis, está disponible un ensayo de unión a anexina usando células BT474. Las células BT474 se cultivan y siembran en placas como se ha analizado en el párrafo anterior. El medio se retira después y se reemplaza con medio nuevo solo o medio que contiene 10 μ g/ml del anticuerpo monoclonal. Después de un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se separan por tripsinización. Las células se centrifugan a continuación, se resuspenden en tampón de unión con Ca²⁺ y se separan en alícuotas en tubos como se ha analizado anteriormente para el ensayo de muerte celular. Los tubos reciben después anexina marcada (por ejemplo anexina V-FTIC) (1 μ g/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software de FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión de anexina en relación con el control se seleccionan como

anticuerpos inductores de apoptosis. Además del ensayo de unión a anexina, está disponible un ensayo de tinción de ADN usando células BT474. Para realizar este ensayo, se incuban células BT474 que se han tratado con el anticuerpo de interés como se ha descrito en los dos párrafos anteriores con HOECHST 33342™ 9 µg/ml durante 2 horas a 37 °C, después se analizan en un citómetro de flujo EPICS ELITE™ (Coulter Corporation) usando software

- 5 MODFIT LT™ (Verity Software House). Pueden seleccionarse anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas que es 2 veces o más (y preferentemente 3 o más) más alto que las células no tratadas (hasta 100 % de células apoptóticas) como anticuerpos pro-apoptóticos usando este ensayo. Véase el documento WO98/17797 para ensayos para cribar con respecto a anticuerpos que inducen apoptosis, tales como 7C2 y 7F3.
- 10 Para cribar con respecto a anticuerpos que se unen a un epítipo en HER2 unido con un anticuerpo de interés, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988), para evaluar si el anticuerpo bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo, tal como 2C4 o Pertuzumab, con HER2. Como alternativa o además, puede realizarse un mapeo de epítopos por métodos conocidos en la técnica y/o se puede estudiar la estructura de
- 15 anticuerpo-HER2 (Franklin et al. Cancer Cell 5: 317-328 (2004)) para ver qué dominio o dominios de HER2 se unen con el anticuerpo.

(viii) Inmunoconjugados

- 20 También se describen inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo una toxina de moléculas pequeñas o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).
- 25 Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados. También se contemplan en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una calicheamicina, una maitansina (Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020), un tricoteno, y CC1065.
- 30 El anticuerpo puede conjugarse con una o más moléculas de maitansina (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina puede, por ejemplo, convertirse a May-SS-Me que puede reducirse a May-SH3 y hacerse reaccionar con el anticuerpo modificado (Chari y col. Cancer Research 52: 127-131 (1992)) para generar un inmunoconjugado de maitansinoide-anticuerpo.
- 35 Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo de HER2 conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos de la calicheamicina es capaz de producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Los análogos estructurales de calicheamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG y θ_1^I (Hinman y col. Cancer Research 53: 3336-3342 (1993) y Lode y col. Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)). Véase, también, Patentes de Estados Unidos Nº 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586; y 5.773.001.
- 40

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de la misma que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, sarcina alfa, las proteínas de

45 *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, el inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

- 50 Puede formarse un inmunoconjugado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Están disponibles diversos isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos de HER2 radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioactivos de Lu.

- 55 Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidíoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído),
- 60 compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato) y compuestos de bis-activo fluorina (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina como se ha descrito en Vitetty col. Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil
- 65

por ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari y col. Cancer Research 52: 127-131 (1992)).

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo de HER2 y un agente citotóxico, por ejemplo por técnicas recombinantes o síntesis peptídica.

Un anticuerpo puede conjugarse con una "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en la predirección tumoral en la que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra paciente, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente clarificador y después la administración de un "ligando" (por ejemplo avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido).

(ix) Otras modificaciones de anticuerpos

Se contemplan en el presente documento otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede ligarse a uno de diversos polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede atraparse en microcápsulas preparadas como, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Puede ser deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de potenciar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o además, pueden introducirse restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una eliminación de células mediada por complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véase Caron y col., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). También pueden prepararse también anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada utilizando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff y col. Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Como alternativa, puede diseñarse mediante ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y puede de este modo potenciarse la lisis por el complemento y las capacidades de ADCC. Véase Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

El documento WO00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, en el que los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácidos en la región Fc del mismo. Preferentemente, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc. Preferentemente la región Fc alterada es una región Fc IgG1 que comprende o consiste en sustituciones en una, dos o tres de estas posiciones.

Se describen anticuerpos con unión y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas en el documento WO99/51642, Patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1, Patente de Estados Unidos N° 6.242.195B1, Patente de Estados Unidos N° 6.528.624B1 y Patente de Estados Unidos N° 6.538.124 (Idusogie y col.). Los anticuerpos comprenden una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc de los mismos.

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.739.277, por ejemplo. Tal como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero de la molécula de IgG *in vivo*. También se describen anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos y semividas en suero aumentadas en el documento WO00/42072 (Presta, L.).

También se contemplan anticuerpos modificados por ingeniería genética con tres o más (preferentemente cuatro) sitios de unión a antígeno funcionales (Solicitud de Estados Unidos N° US2002/0004587 A1, Miller y col.).

Los anticuerpos de HER2 divulgados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por procedimientos conocidos en la materia, tal como se describe en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang y col., Proc Natl Acad Sci USA, 77:4030 (1980); las Patentes de Estados Unidos N.º 4.485.045 y 4.544.545; y el documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con

una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención con los liposomas como se describe en Martin y col. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase, Gabizon y col. J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989).

IV. Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones terapéuticas de las composiciones de la presente invención mezclando la composición con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes y/o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Se describen formulaciones de anticuerpos de HER2 liofilizados en el documento WO 97/04801. En el documento US20006/088523 se describen formulaciones particularmente preferentes para la presente composición.

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además anticuerpos que se unen con EGFR, HER2 (por ejemplo, un anticuerpo que se une con un epítipo diferente en HER2), HER3, HER4 o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en una formulación. Como alternativa o además, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal, fármaco dirigido a EGFR, agente anti-angiogénico, inhibidor de tirosina quinasa y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes convenientemente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los ingredientes activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como la serie LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-ácido D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son generalmente estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

V. Tratamiento con la composición de anticuerpo de HER2

Se contempla que, de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo de HER2 puede usarse para tratar el cáncer. El cáncer comprenderá generalmente células HER2 positivas, de modo que el anticuerpo de HER2 en el presente documento es capaz de unirse con las células cancerosas. En una realización, el cáncer expresa HER3 bajo (por ejemplo, cáncer de ovario) o tiene una relación HER2:HER3 elevada (por ejemplo, cáncer de ovario). Diversos cánceres que pueden tratarse con la composición se enumeran en la sección de definiciones anterior.

Los cánceres preferentes a ser tratados en el presente documento incluyen: cáncer de mama, incluyendo cáncer de mama HER2 positivo, opcionalmente en combinación con trastuzumab y taxoide tal como docetaxel e incluyendo terapia neoadyuvante de cáncer de mama; cáncer de ovario (incluyendo cáncer de ovario resistente a platino y sensible a platino) (véase documento US2006/0013819, por ejemplo); cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de

pulmón no microcítico, NSCLC), opcionalmente en combinación con un inhibidor de EGFR (véase documento WO 2007/0020261, por ejemplo); cáncer colorrectal, etc.

También se contempla que el anticuerpo de HER2 puede usarse para tratar diversas enfermedades o trastornos no malignos, tales como enfermedad autoinmune (por ejemplo psoriasis); endometriosis; escleroderma; reestenosis; pólipos tales como pólipos del colon, pólipos nasales o pólipos gastrointestinales; fibroadenoma; enfermedades respiratorias; colecistitis; neurofibromatosis; enfermedad renal poliquística; enfermedades inflamatorias; trastornos cutáneos incluyendo psoriasis y dermatitis; enfermedad vascular; afecciones que implican la proliferación anómala de células epiteliales vasculares; úlceras gastrointestinales; enfermedad de Menetrier, adenomas secretores o síndrome de pérdida de proteínas; trastorno renal; trastornos angiogénicos; enfermedad ocular tal como degeneración macular relacionada con la edad, síndrome de presunta histoplasmosis ocular, neovascularización retiniana de retinopatía diabética proliferativa, vascularización retinal, retinopatía diabética o degeneración macular relacionada con la edad; patologías asociadas con el hueso tales como osteoartritis, raquitismo y osteoporosis; daño posterior a un evento isquémico cerebral; enfermedades fibróticas o edematosas, tales como cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, tiroiditis, síndrome de hiperviscosidad sistémica, enfermedad de Osler Weber-Rendu, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, o edema posterior a quemaduras, traumatismo, radiación, ictus, hipoxia o isquemia; reacción de hipersensibilidad de la piel; retinopatía diabética y nefropatía diabética; síndrome de Guillain-Barre; enfermedad de injerto contra huésped o rechazo de trasplante; enfermedad de Paget; inflamación de huesos o articulaciones; fotoenvejecimiento (por ejemplo provocado por radiación de UV de la piel humana); hipertrofia prostática benigna; ciertas infecciones microbianas incluyendo patógenos microbianos seleccionados de adenovirus, hantavirus, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia* spp. y *Bordetella pertussis*; trombos provocados por agregación de plaquetas; afecciones reproductoras tales como endometriosis, síndrome de hiperestimulación ovárica, preeclampsia, hemorragia uterina disfuncional o menometrorragia; sinovitis; ateroma; nefropatías agudas y crónicas (incluyendo glomerulonefritis proliferativa y enfermedad renal inducida por diabetes); eccema; formación de cicatriz hipertrófica; choque endotóxico e infección fúngica; poliposis adenomatosa familiar; enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y degeneración cerebelosa); síndromes mielodisplásicos; anemia aplásica; lesión isquémica; fibrosis del pulmón, riñón o hígado; enfermedad de hipersensibilidad mediada por linfocitos T; estenosis pilórica hipertrófica infantil; síndrome obstructivo urinario; artritis psoriásica; y tiroiditis de Hashimoto. Las indicaciones no malignas preferentes para terapia en el presente documento incluyen psoriasis, endometriosis, esclerodermia, enfermedad vascular (por ejemplo, reestenosis, aterosclerosis, enfermedad de las arterias coronarias o hipertensión), pólipos del colon, fibroadenoma o enfermedad respiratoria (por ejemplo, asma, bronquitis crónica, bronquiectasia o fibrosis quística).

El tratamiento con el anticuerpo de HER2 dará como resultado una mejora en las señales o síntomas de enfermedad. Por ejemplo, cuando la enfermedad que se trata es cáncer, dicha terapia puede dar como resultado una mejora de la supervivencia (supervivencia general y/o supervivencia sin progresión) y/o puede dar como resultado una respuesta clínica objetiva (parcial o completa).

Preferentemente, el anticuerpo de HER2 en la composición administrada es un anticuerpo desnudo. Sin embargo, el anticuerpo de HER2 administrado puede conjugarse con un agente citotóxico. Preferentemente, el inmunoconjugado y/o proteína de HER2 con el que se une se internaliza o internalizan por la célula, dando como resultado una eficacia terapéutica aumentada del inmunoconjugado en la destrucción de la célula cancerosa con la que se une. En una realización preferida, el agente citotóxico se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, calicheamicinas, ribonucleasas y endonucleasas de ADN.

El anticuerpo de HER2 puede administrarse a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa de la composición de anticuerpo.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo de HER2 dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo de HER2 se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y su respuesta al anticuerpo de HER2, y el criterio del médico a cargo. El anticuerpo de HER2 se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 50 µg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo de HER2 es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. En una realización, el tiempo de infusión inicial para el anticuerpo de HER2 puede ser mayor que los tiempos de infusión posteriores, por ejemplo, aproximadamente 90 minutos para la infusión inicial y aproximadamente 30 minutos para infusiones posteriores (si se tolera bien la infusión inicial). La dosificación preferente del anticuerpo de HER2 estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de

modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo de HER2). Puede administrarse una dosis de carga inicial superior, seguida de una o más dosis inferiores. En una realización, el anticuerpo de HER2 puede administrarse como una dosis de carga de aproximadamente 840 mg seguida de aproximadamente 420 mg a aproximadamente cada 3 semanas. En otra

realización, el anticuerpo de HER2 puede administrarse como una dosis de carga de aproximadamente 1050 mg seguida de aproximadamente 525 mg a aproximadamente cada 3 semanas.

Otros agentes terapéuticos pueden combinarse con el anticuerpo de HER2. Tal administración combinada incluye la coadministración o administración simultánea, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que, preferentemente, hay un período de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen sus actividades biológicas de forma simultánea. Por lo tanto, el otro agente terapéutico puede administrarse antes de, o después de, la administración del anticuerpo de HER2. En esta realización, el tiempo entre al menos una administración del otro agente terapéutico y al menos una administración del anticuerpo de HER2 es preferentemente de aproximadamente 1 mes o menos, y más preferentemente de aproximadamente 2 semanas o menos. Como alternativa, el otro agente terapéutico y el anticuerpo de HER2 se administran simultáneamente al paciente, en una única formulación o formulaciones separadas.

Los ejemplos de otros agentes terapéuticos que pueden combinarse con el anticuerpo de HER2 incluyen uno cualquiera o más de: un agente quimioterapéutico, tal como un antimetabolito, por ejemplo gemcitabina; un segundo anticuerpo de HER2 diferente (por ejemplo, un anticuerpo de HER2 inhibidor del crecimiento tal como Trastuzumab, o un anticuerpo de HER2 que induce la apoptosis de una célula que sobreexpresa HER2, tal como 7C2, 7F3 o variantes humanizadas de los mismos); un segundo anticuerpo dirigido contra otro antígeno asociado a tumor, tal como EGFR, HER3, HER4; compuesto antihormonal, *por ejemplo*, un compuesto antiestrógeno tal como tamoxifeno, o un inhibidor de aromatasa; un cardioprotector (para prevenir o reducir cualquier disfunción miocárdica asociada con la terapia); una citocina; un fármaco dirigido a EGFR (tal como Erlotinib, Gefitinib, o Cetuximab); un agente anti-angiogénico (especialmente Bevacizumab comercializado por Genentech con la marca comercial AVASTIN®); un inhibidor de tirosina quinasa; un inhibidor de COX (por ejemplo un inhibidor de COX-1 o COX-2); fármaco antiinflamatorio no esteroideo, Celecoxib (CELEBREX®); inhibidor de farnesil transferasa (por ejemplo, Tipifarnib/ZARNESTRA® R115777 disponible de Johnson y Johnson o Lonafarnib SCH66336 disponible de Schering-Plough); anticuerpo que se une con la proteína oncofetal CA 125 tal como Oregovomab (MoAb B43.13); vacuna de HER2 (tal como vacuna de HER2 AutoVac de Pharmexia, o vacuna de proteína APC8024 de Dendreon, o vacuna de péptido de HER2 de GSK/Corixa); otra terapia de dirección a HER (por ejemplo, trastuzumab, cetuximab, gefitinib, erlotinib, CI1033, GW2016 etc.); inhibidor de Raf y/o ras (véase, por ejemplo, WO 2003/86467); Doxil; Topotecan; taxano; GW572016; TLK286; EMD-7200; un medicamento que trata las náuseas tal como un antagonista de serotonina, esteroide o benzodiazepina; un medicamento que previene o trata la erupción cutánea o terapias de acné convencionales, incluyendo antibiótico tópico u oral; un medicamento reductor de la temperatura corporal tal como un acetaminofeno, difenhidramina o meperidina; factor de crecimiento hematopoyético, etc.

Son dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriormente las usadas en la actualidad y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y del anticuerpo de HER2. El tratamiento con la combinación de la composición anticuerpo de HER2 y otro agente terapéutico puede dar como resultado un beneficio terapéutico sinérgico, o mayor que el aditivo, al paciente.

Si se administra un agente químico terapéutico, este se administra habitualmente a dosificaciones conocidas para el mismo, u opcionalmente reducidas debido a la acción combinada de los fármacos o efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico. Puede usarse la preparación y programas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como se determine de forma empírica por el experto en la materia. La preparación y los programas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)).

Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a retirada quirúrgica de células cancerosas y/o radioterapia.

VII. Depósito de materiales

Las siguientes líneas celulares de hibridomas se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, Estados Unidos (ATCC):

Designación de anticuerpo	Nº de ATCC	Fecha del depósito
7C2	ATCC HB-12215	jueves, 17 de octubre de 1996
7F3	ATCC HB-12216	jueves, 17 de octubre de 1996
4D5	ATCC CRL 10463	jueves, 24 de mayo de 1990

Se ilustran más detalles de la invención por el siguiente Ejemplo no limitante.

Ejemplo 1

Este ejemplo describe la caracterización de una composición que comprende una especie principal de anticuerpo de HER2 que se une al dominio II de HER2 (pertuzumab) y variantes ácidas del mismo.

El Pertuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante, generado basándose en el marco conservado de IgG1 humano (κ). Comprende dos cadenas pesadas (448 restos) y dos cadenas ligeras (214 restos). Las dos cadenas pesadas están ligadas por dos disulfuros intercatenarios y cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un disulfuro intercatenario. Hay un sitio de glucosilación ligado a N en la región Fc de pertuzumab en Asn-299 de las dos cadenas pesadas. El pertuzumab difiere de HERCEPTIN® (Trastuzumab) en las regiones de unión a epítomos de la cadena ligera (12 diferencias de aminoácidos) y la cadena pesada (30 diferencias de aminoácidos). Como resultado de estas diferencias, el pertuzumab se une con un epítipo completamente diferente en el receptor HER2. La unión de pertuzumab con el receptor HER2 en células epiteliales humanas evita que forme complejos con otros miembros de la familia del receptor HER (Agus y col., Cancer Cell 2:127-137 (2002)). Bloqueando la formación de complejos, el pertuzumab evita los efectos estimuladores del crecimiento de ligandos para los complejos (por ejemplo, EGF y herregulina). Los experimentos *in vitro* demostraron que tanto pertuzumab como pertuzumab-Fab inhiben la unión de herregulina (HRG) a células MCF7 y que la fosforilación estimulada por HRG del complejo de HER2-HER3 puede inhibirse tanto por pertuzumab como por pertuzumab-Fab (Agus y col., Cancer Cell 2: 127-137 (2002)). Además, se descubrió que la inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral por pertuzumab y un Fab derivatizado con polietilenglicol de pertuzumab era comparable en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata murino (Agus y col., Cancer Cell 2: 127-137 (2002)). Estos datos sugieren que la región Fc del anticuerpo no es necesaria para la inhibición del crecimiento tumoral, y además, no se requiere bivalencia y funciones efectoras mediadas por Fc para actividad biológica *in vivo* o *in vitro*.

En este ejemplo, el pico principal de pertuzumab se recogió a partir de una columna de intercambio catiónico y se incubó en medio de cultivo celular usando operaciones de purificación de anticuerpo estándar. Se formaron variante ácidas tras la incubación del pico principal con componentes de medio de cultivo celular. Las variantes ácidas de anticuerpos monoclonales son formas modificadas del producto deseado que se eluyen más temprano que el pico principal al separarlas mediante cromatografía de intercambio catiónico. A menudo se observan diferencias sutiles en la cantidad y/o distribución de variantes ácidas de cambios pre- y post-proceso y suponen un reto para demostrar la comparabilidad del producto. Las operaciones de purificación tenían muy poco efecto en la formación de variantes ácidas. Las variantes identificadas en la fracción de variante ácida incluían variante glicada, variante deamidada, variante reducida por disulfuro, variante sialilada o variante no reducida. En conjunto, las variantes ácidas fueron completamente potentes.

Entre otros objetos, el fin del presente estudio era: entender mejor el impacto del cultivo celular y procesos de recuperación en la formación de variante ácida de pertuzumab, caracterizar las variantes ácidas predominantes de pertuzumab y evaluar el impacto de las variantes ácidas en la farmacocinética (PK).

Los resultados farmacocinéticos en ratas mostraron que el área bajo la curva para la fracción de variante ácida y la fracción de pico principal fueron equivalentes al material de partida de pertuzumab (relaciones medias geométricas 0,96 y 0,95 respectivamente). Estos resultados demuestran que aunque las variantes ácidas son químicamente distintas del pico principal tienen una farmacocinética equivalente.

Métodos y resultados

La Figura 10 representa el diseño experimental para el aislamiento del pico principal (MP) de intercambio catiónico y AV (variantes ácidas), el cultivo celular, recuperación y evaluación y ensayos analíticos de FC (farmacocinética). Medio nuevo = medio estándar; medio usado = medio estándar después de 12 días de cultivo celular, las células se retiraron mediante centrifugación. Oxígeno disuelto, pH y otros parámetros no se sometieron a control.

A. Aislamiento de pico principal y variantes ácidas

Las variantes de carga de pertuzumab se separaron en una columna de intercambio catiónico (CEX) DIONEX PROPAC WCX-10™ de 4,0 x 250 mm usando las siguientes condiciones:

Tampón A: 20 mM de BisTris, pH 6,0
Tampón B: 20 mM de BisTris, NaCl 200 mM, pH 6,0
Gradiente: 0,5 % B /min suministrado a 1,0 ml/min
Temperatura de la Columna: 35°C
Detección: 280 nm

En la Figura 11 se muestra un cromatograma típico. Se recolectó la AV (variante ácida) y MP (pico principal).

La potencia y contenido de monómero fue similar entre el material de partida de pertuzumab, el pico principal y las variantes ácidas (Figura 12). La pureza del pico principal y las fracciones CEX de variante ácida fue aceptable para los estudios de farmacocinética basándose en el criterio de 90 % de pureza mediante CEX (Figura 12).

B. Experimentos de agregado del pico principal

El pico principal de Pertuzumab aislado mediante CEX se agregó en medio de cultivo celular nuevo o usado (sin células) y se incubó durante 12 días a 37 °C tal como se indica en la Figura 10. Las muestras en diversos puntos de tiempo se analizaron directamente mediante CEX o después del aislamiento mediante proteína A. El pico principal también se agregó en el medio +/- diversos componentes de medio tales como glucosa y peptona. Además, el pico principal se procesó a través de operaciones de recuperación estándar tales como cromatografía de proteína A (ProA), tratamiento de pH bajo, y flujo rápido de sefaroza SP (SPFF) durante múltiples ciclos y se analizó mediante CEX.

Los perfiles de CEX del pico principal incubados durante 12 días en medio nuevo o usado fueron similares (Figuras 13 y 14). El pico principal disminuyó más después de la incubación en medio nuevo que en medio usado. La retirada de diversos componentes del medio afectó la disminución del pico principal. El porcentaje de pico principal en muestras incubadas fue el mismo que sin el aislamiento de proteína A. La incubación en tampón de medio solo causó una pérdida del pico principal.

El aislamiento de la proteína A del pico principal del medio no afectó el perfil de CEX demostrando que las modificaciones durante la incubación no afectan la unión o elución de proteína A. Las operaciones de recuperación tuvieron poco o ningún efecto en el porcentaje de pico principal de CEX.

C. Caracterización de variantes ácidas

Las variantes ácidas de pertuzumab se aislaron mediante CEX del material de partida de pertuzumab o pico principal incubado en medio de cultivo celular. Las variantes ácidas aisladas se analizaron mediante métodos enumerados en la Figura 15. Las variantes ácidas comprenden el 21 % del área de pico total, por lo tanto, aproximadamente el 80 % (17 % del 21 %) de las variantes ácidas fue identificado. Las formas deamidadas no pudieron cuantificarse.

Las formas identificadas en variantes ácidas generadas mediante pico principal incubado en medio fueron las mismas que las identificadas en el material de partida de pertuzumab. Se detectaron las siguientes formas: variante sialilada, variante reducida por disulfuro, variante glicada, variante no reducible y variante deamidada. Se identificaron formas glicadas de orden superior mediante espectrometría de masas de ionización-electropulverización (ESI-MS) después de la reducción y tratamiento con PNGasa.

D. Estudio de farmacocinética (PK)

Una dosis única intravenosa (IV) de 10 mg/kg, 12 ratas por rama, 3 ramas (variantes ácidas, pico principal, material de partida de pertuzumab). Se llevó un muestreo de PK extensivo durante 35 días. Relación media geométrica de AUC (Día 0-14) entre ácida, pico principal, y material de partida de pertuzumab. Relación media geométrica = Muestra de GM/Material de partida de IgG1 GM. La concentración de pertuzumab frente a la curva de tiempo fueron similares para el material de partida de pertuzumab, variante ácida y pico principal (Figura 16 y 17). No se observó una diferencia significativa entre las variantes ácidas, pico principal, y material de partida de pertuzumab. El GMR fue de ~1.0 con 90% de IC entre 0,80 - 1,25.

Conclusiones

Múltiples factores de cultivo celular contribuyen a la formación de variante ácida, pero la recuperación no mostró efectuar una formación de variante ácida. Se identificaron variantes reducidas por disulfuro, no reducibles, sialiladas, glicadas y deamidadas en la fracción ácida. La fracción ácida aislada del material de partida de pertuzumab y las generadas mediante incubación del pico principal de CEX contenían las mismas formas. Las variantes ácidas, el pico principal y el material de partida de pertuzumab tenían la misma farmacocinética.

Listado de secuencias

<110> GENENTECH, INC. HARRIS, REED J. MOTCHNIK, PAUL A.

<120> COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE UN ANTICUERPO QUE SE UNE AL DOMINIO II DE HER2 Y VARIANTES ÁCIDAS DEL MISMO

<130> P4169R1 WO

ES 2 668 680 T3

<141> 2009-01-28

<150> US 61/024.825

<151> 2008-01-30

5

<160> 24

<210> 1

<211> 107

10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

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

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

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

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

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

Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
95 100 105

Ile Lys

15

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

20

<400> 2

ES 2 668 680 T3

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

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 119

ES 2 668 680 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> la secuencia se sintetiza

<400> 4

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

<210> 5

<211> 107

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> la secuencia se sintetiza

<400> 5

ES 2 668 680 T3

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

<210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

<400> 6

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

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 668 680 T3

<220>
 <223> La secuencia se sintetiza.

5 <220>
 <221> Xaa
 <222> 10
 <223> Xaa es preferentemente D o S

10 <400> 7
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa 5 10

15 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> La secuencia se sintetiza.

20 <400> 8

Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	Asn	Gln	Arg	Phe
1				5					10					15

Lys Gly

25 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> La secuencia se sintetiza.

30 <400> 9

		Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr
						5				10	

35 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> La secuencia se sintetiza.

40 <400> 10

		Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Ile	Gly	Val	Ala
						5					10	

45 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza

55 <220>
 <221> Xaa
 <222> 5
 <223> Xaa es preferentemente R o L

60 <220>

ES 2 668 680 T3

<221> Xaa
<222> 6
<223> Xaa es preferentemente Y o E

5 <220>
 <221> Xaa
 <222> 7
 <223> Xaa es preferentemente T o S

10 <400> 11

Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa
5

15 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> La secuencia se sintetiza.

<400> 12

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
5

25

<210> 13
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza.

<400> 13

ES 2 668 680 T3

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

<210> 14

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

10

<400> 14

ES 2 668 680 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys		20	25	30	
Asp	Thr	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu		35	40	45	
Glu	Trp	Val	Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr		50	55	60	
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser		65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp		80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr		95	100	105	
Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser		110	115	120	
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser		125	130	135	
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys		140	145	150	
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala		155	160	165	
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser		170	175	180	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser		185	190	195	
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser		200	205	210	
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys		215	220	225	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly		230	235	240	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met		245	250	255	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser		260	265	270	
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val		275	280	285	
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn		290	295	300	

ES 2 668 680 T3

Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	305	310	315
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	320	325	330
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	335	340	345
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	350	355	360
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	365	370	375
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	380	385	390
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	395	400	405
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	410	415	420
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	425	430	435
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		440	445	

<210> 15

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> La secuencia se sintetiza.

<400> 15

ES 2 668 680 T3

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

<210> 16

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia se sintetiza.

10

<400> 16

ES 2 668 680 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr
				20					25					30
Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr
				50					55					60
Asn	Gln	Arg	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr
				95					100					105
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala
				110					115					120
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
				125					130					135
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp

ES 2 668 680 T3

				140					145					150
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu
				155					160					165
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly
				170					175					180
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
				185					190					195
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
				200					205					210
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
				215					220					225
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
				230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245					250					255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
				260					265					270
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
				275					280					285
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
				290					295					300
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
				305					310					315
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
				320					325					330
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
				335					340					345
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met
				350					355					360
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				365					370					375
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
				380					385					390
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
				395					400					405
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
				410					415					420
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
				425					430					435
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
				440					445					

ES 2 668 680 T3

<211> 233
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> La secuencia se sintetiza.

<400> 17

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	1	5	10	15
Gly	Val	His	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	20	25	30	
Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	35	40	45	
Gln	Asp	Val	Ser	Ile	Gly	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	50	55	60	
Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	65	70	75	
Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	80	85	90	
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	95	100	105	
Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	110	115	120	
Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	125	130	135	
Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	140	145	150	
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	155	160	165	
Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	170	175	180	
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	185	190	195	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	200	205	210	
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	215	220	225	
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	230										

10

<210> 18
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

ES 2 668 680 T3

<220>

<223> La secuencia se sintetiza.

<400> 18

5

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	
1				5					10					15	
Gly	Val	His	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	
				20					25					30	
Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	
				35					40					45	
Phe	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	
				50					55					60	
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	
				65					70					75	
Gly	Ser	Ile	Tyr	Asn	Gln	Arg	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	
				80					85					90	
Val	Asp	Arg	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	
				95					100					105	
Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	
				110					115					120	
Pro	Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
				125					130					135	
Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
				140					145					150	
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	
				155					160					165	
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
				170					175					180	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
				185					190					195	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				200					205					210	
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
				215					220					225	
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	
				230					235					240	
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	
				245					250					255	
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
				260					265					270	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	

ES 2 668 680 T3

				275						280					285
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	
				290					295					300	
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
				305					310					315	
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
				320					325					330	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	
				335					340					345	
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	
				350					355					360	
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
				365					370					375	
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	
				380					385					390	
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
				395					400					405	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
				410					415					420	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
				425					430					435	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				440					445					450	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
				455					460					465	
Pro	Gly														

<210> 19
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 19

ES 2 668 680 T3

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

<210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 20

ES 2 668 680 T3

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

<210> 21
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

ES 2 668 680 T3

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

<210> 22
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22

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

ES 2 668 680 T3

				80					85					90
Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	Leu	Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys
				95					100					105
Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Cys	Gln	Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys
				110					115					120
Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	Asp	Lys	Gly	Cys	Pro	Ala	Glu
				125					130					135
Gln	Arg	Ala	Ser	Pro	Leu	Thr								
				140										

<210> 23

<211> 217

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> La secuencia se sintetiza.

<400> 23

ES 2 668 680 T3

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

<210> 24

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia se sintetiza.

10

<400> 24

ES 2 668 680 T3

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

ES 2 668 680 T3

His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	230	235	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	260	265	270
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	275	280	285
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	290	295	300
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	305	310	315
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	320	325	330
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	335	340	345
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	350	355	360
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	365	370	375
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	380	385	390
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	395	400	405
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	410	415	420
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	425	430	435
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		440	445	

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un anticuerpo de HER2 de especie principal que comprende secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada en SEQ ID NO.15 y 16 respectivamente y que se une al dominio II de HER2 y variantes ácidas de ese anticuerpo de especie principal, en donde el anticuerpo de HER2 de especie principal es la estructura de secuencia de aminoácidos de anticuerpo que es la moléculas de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición y el anticuerpo de HER2 de especie principal y las variantes ácidas son todos anticuerpos intactos, en donde las variantes ácidas incluyen una variante reducida por disulfuro y/o una variante no reducible.
2. La composición de la reivindicación 1 en la que las variantes ácidas comprenden además una variante glicada, una variante deamidada y/o una variante sialilada.
3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la que la cantidad de las variantes ácidas es inferior al 25 %.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende una extensión líder amino-terminal del anticuerpo de especie principal.
5. La composición de la reivindicación 4 en la que la extensión líder amino-terminal comprende o consiste en VHS-.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende adicionalmente una variante de secuencia de aminoácidos del anticuerpo de HER2 de especie principal que comprende un resto de lisina C-terminal en una o ambas cadenas pesadas del mismo y/o uno o más restos de metionina oxidada.
7. Una formulación farmacéutica que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. La formulación farmacéutica de la reivindicación 7 para su uso en un método de tratamiento de cáncer HER2 positivo en un paciente, en donde en el método la formulación farmacéutica de la reivindicación 7 se administra al paciente en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.
9. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde en el método la composición farmacéutica se administra en combinación con Trastuzumab.
10. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9 en donde el cáncer se selecciona a partir del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón y cáncer colorrectal.
11. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en donde el cáncer es cáncer gástrico.
12. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9 en donde el anticuerpo de especie principal y las variantes ácidas tienen esencialmente la misma farmacocinética.
13. Un método para preparar una composición farmacéutica que comprende: (1) preparar una composición que comprende un anticuerpo de HER2 de especie principal que comprende secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada en SEQ ID NO. 15 y 16 respectivamente y que se une al dominio II de HER2 y a variantes ácidas de ese anticuerpo de HER2 de especie principal incluyendo una variante reducida por disulfuro y/o una variante no reducible, en donde el anticuerpo de HER2 de especie principal es la estructura de secuencia de aminoácidos de anticuerpo en la composición que es la molécula de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición y el anticuerpo de HER2 de especie principal y las variantes ácidas son todos anticuerpos intactos, y (2) evaluar las variantes ácidas en la composición y confirmar que la cantidad de las mismas es inferior a aproximadamente el 25 %.
14. El método de la reivindicación 13, en donde las variantes ácidas de ese anticuerpo de HER2 de especie principal incluyen una variante glicada, una variante deamidada y/o una variante sialilada.
15. El método de las reivindicaciones 13 o 14 en el que la etapa (2) comprende evaluar las variantes ácidas mediante un método seleccionado a partir del grupo que consiste en cromatografía de intercambio iónico en donde la composición se trata con sialidasa, electroforesis de zona capilar reducida con dodecil sulfato sódico (CE-SDS), CE-SDS no reducida, cromatografía de boronato y mapeo peptídico.
16. El método de la reivindicación 13 o 14 en donde la etapa (2) comprende evaluar las variantes ácidas mediante cromatografía de intercambio iónico.

17. El método de la reivindicación 16 que comprende cromatografía de intercambio catiónico usando un intercambiador catiónico con un grupo funcional carboxilato.

5 18. El método de la reivindicación 17 en el que las condiciones para la cromatografía implican: Tampón A de 20 mM de BisTris, pH 6,0; Tampón B de 20 mM de BisTris, NaCl 200 mM, pH 6,0; y un gradiente del 0,5 % de Tampón B a 1,0 ml/min.

19. El método de las reivindicaciones 13 o 14 que comprende combinar la composición después de la etapa (2) con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 20. El método de las reivindicaciones 13 o 14 en el que la composición evaluada en la etapa (2) es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

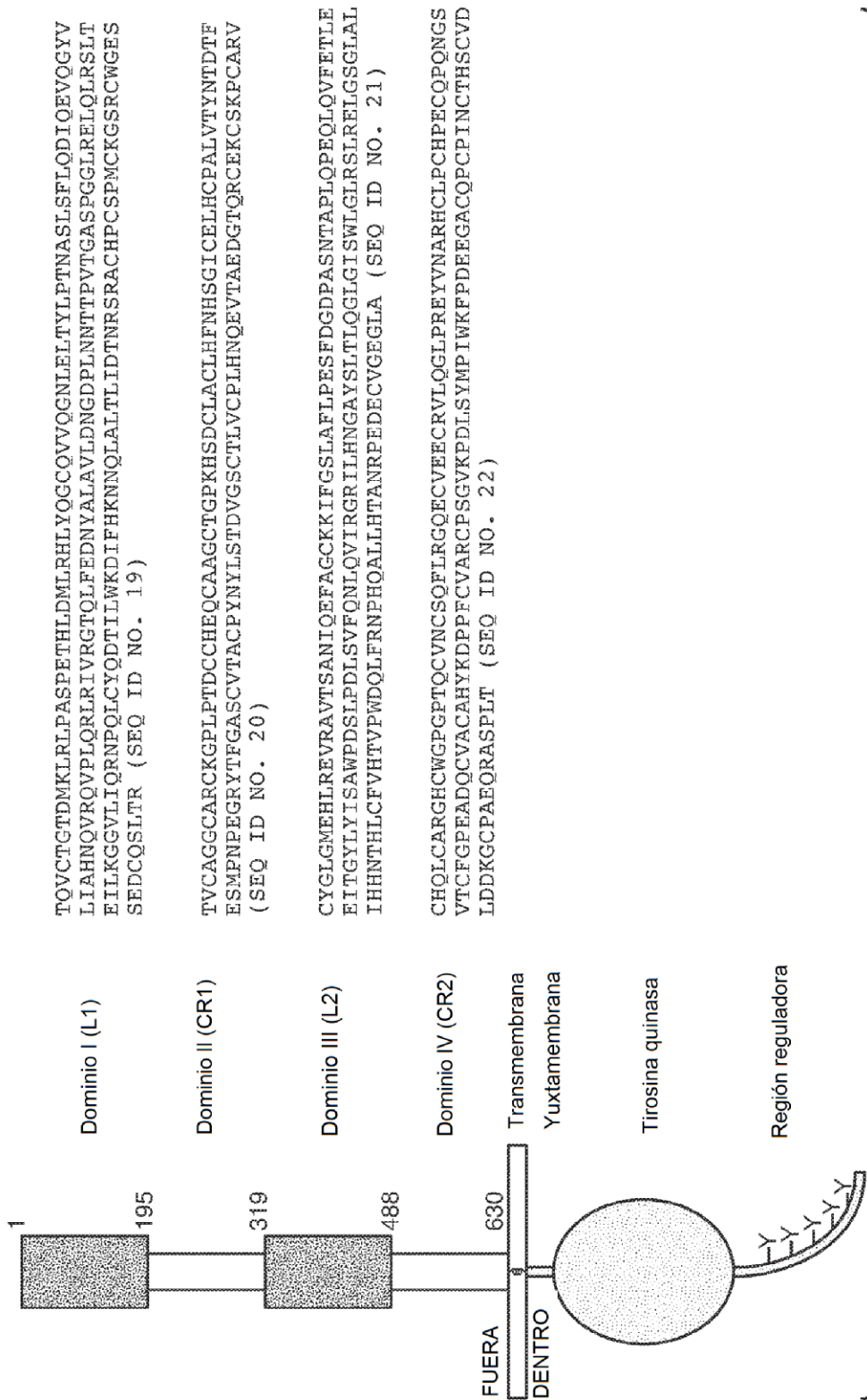


FIG. 1

Variable ligera

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQR	P
	** **** *	*		*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQKP	
		* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP	

	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	** *	*	*	*
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ	P	
	* *****			
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ	P	

	90	100	
2C4	EDLAVYYC [QQYIYPYT]	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1)	
	* *	* *	
574	EDFATYYC [QQYIYPYT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:3)	
	*** *		
hum κI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:5)	

FIG. 2A**Variable pesada**

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGT	SVKISCKAS [GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** ** * **** *		*	*
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAAS [GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		** * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAAS [GFTFSSYAMS]	WVRQA	

	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSSGSIYNQRFKG]	KASLTVD	RSSRI	VYM
	* * **	*** *	**** *	
574	PGKGLEWVA [DVNPNSSGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	***** **** * *	*	*	*
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDN	SKNTLYL	

	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:2)	
	*** **		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:4)	

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:6)	

FIG. 2B

Secuencia de aminoácidos para cadena ligera de pertuzumab

1 10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSIQVAWYQOKPGKAPKLLIYSASRYRTGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
 190 200 210
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 3A**Secuencia de aminoácidos para cadena pesada de pertuzumab**

1 10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY
 70 80 90 100 110 120
 NORFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSA
 130 140 150 160 170 180
 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 190 200 210 220 230 240
 LYSLSVVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 250 260 270 280 290 300
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 310 320 330 340 350 360
 TYRVVSVLTVQLHQLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 370 380 390 400 410 420
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 430 440 448
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

FIG. 3B

```

1  M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S      45
46 Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F      90
91 T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F      135
136 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E      180
181 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E X H K V Y A C E V T H Q C L S S P V T      225
226 K S F N R G E C      233
      (SEQ ID NO. 17)

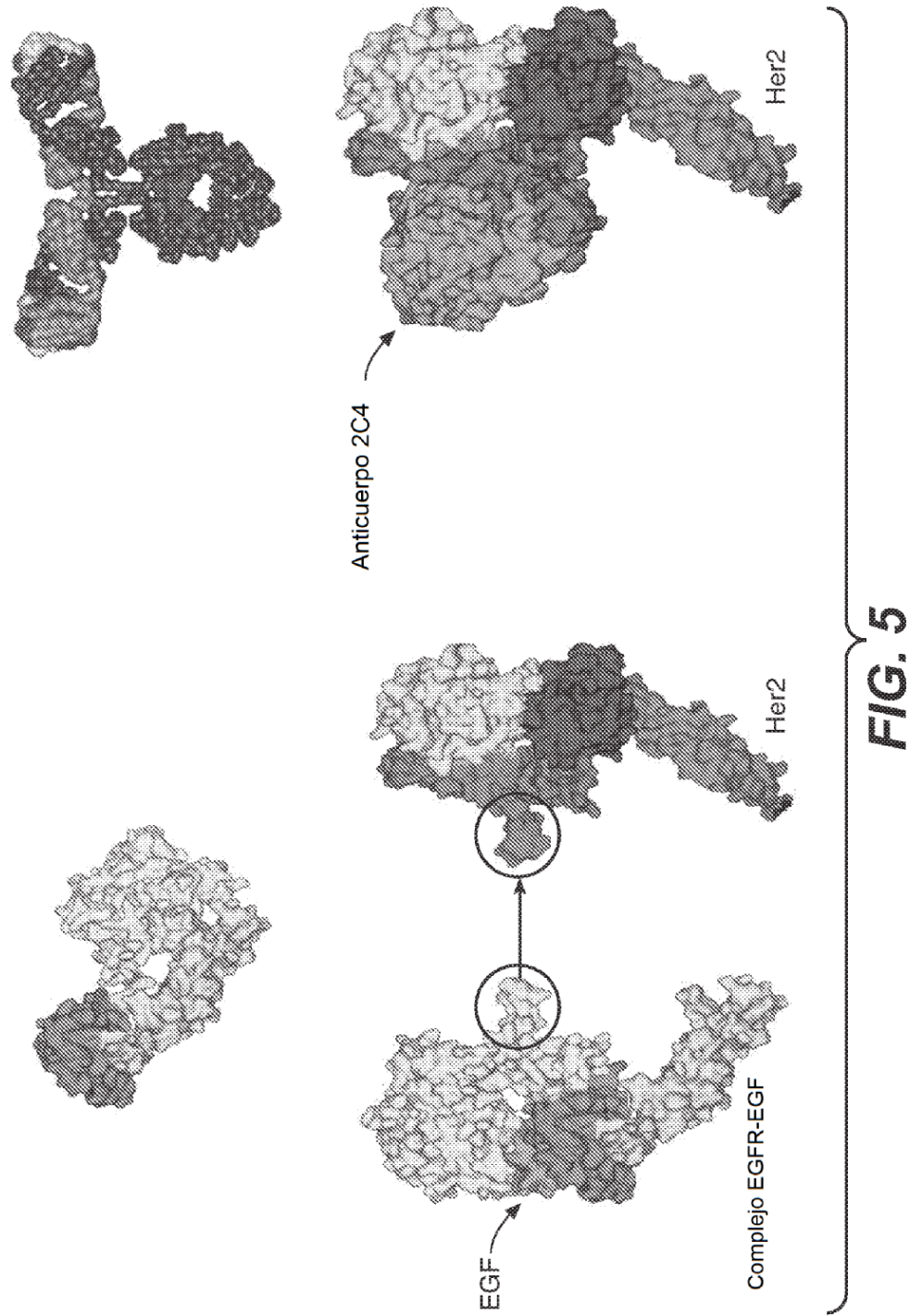
```

FIG. 4A

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G 45
 46 F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S 90
 91 V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T 135
 136 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N 180
 181 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H 225
 226 K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D 270
 271 T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E 315
 316 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A 360
 361 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N 405
 406 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H 450
 451 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (SEQ ID NO. 18) 465

FIG. 4B

Heterodímeros EGFR activados por ligando con enlaces HER2 2C4 en el sitio de unión heterodimérico



Acoplamiento de HER2/3 con las rutas de MAPK y Akt

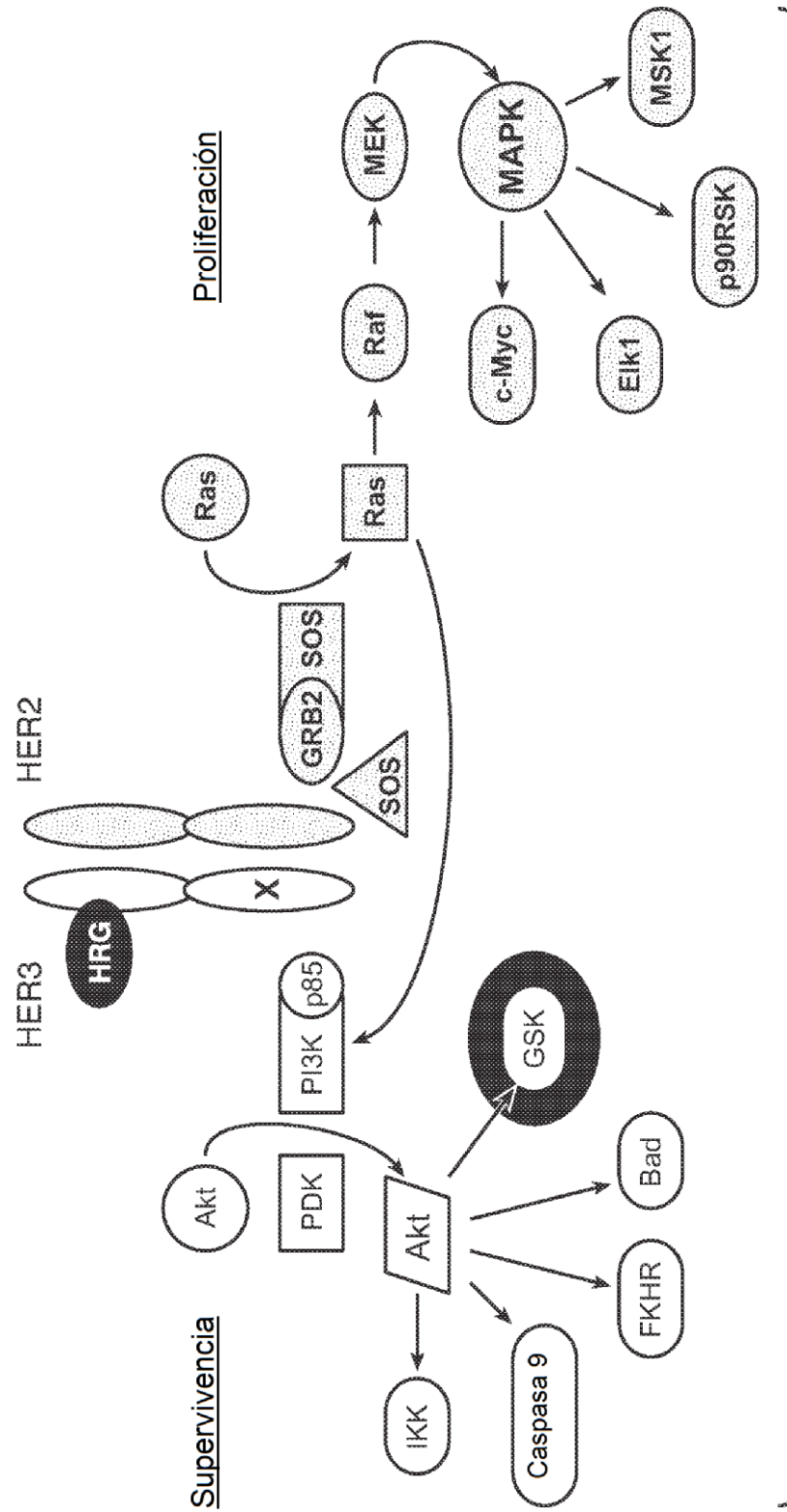


FIG. 6

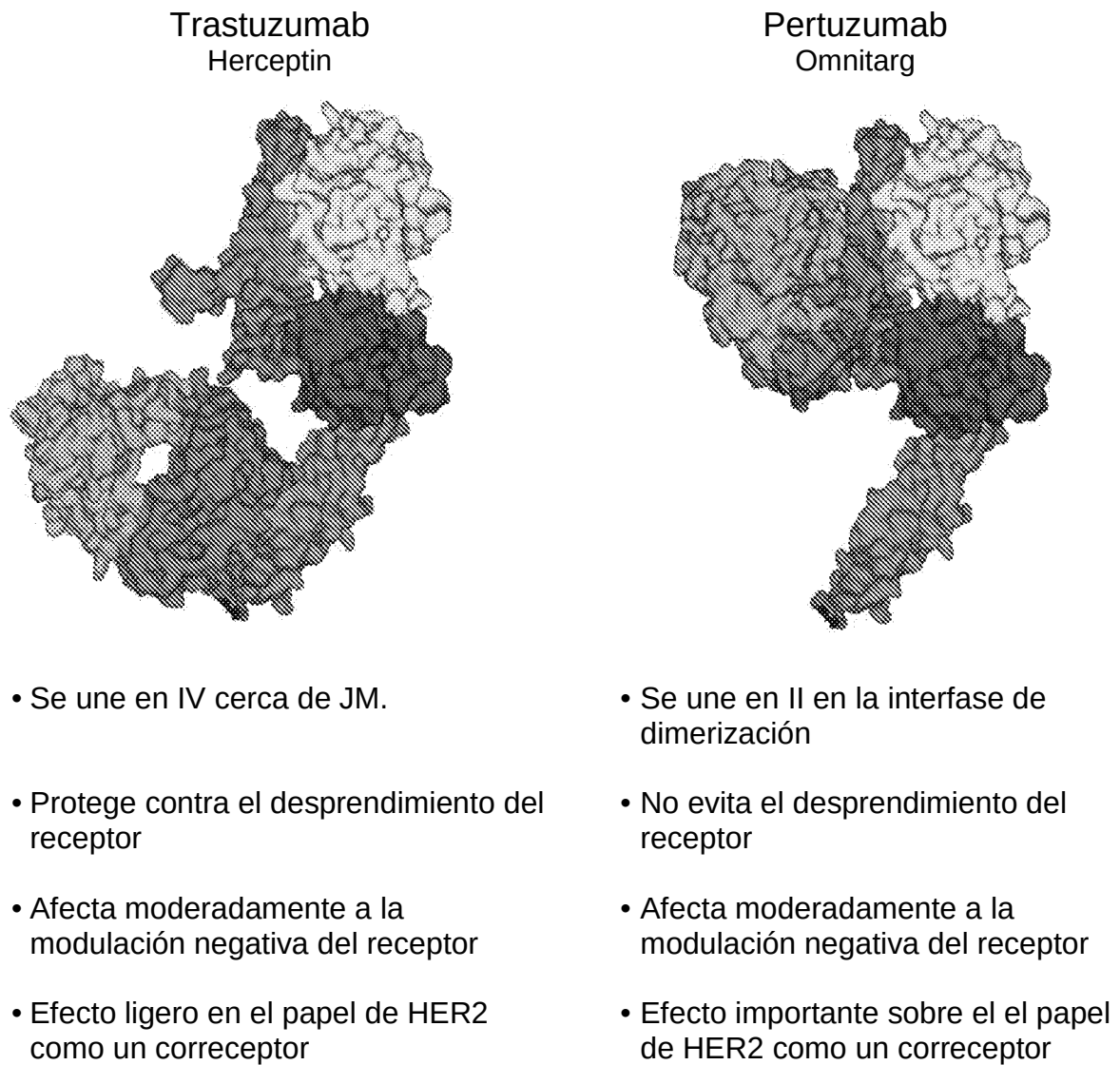


FIG. 7

Cadena ligera

```

1      15      30      45
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K

46      60      75      90
L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q

91      105      120      135
H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L

136      150      165      180
L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T

181      195      210      214
L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

```

FIG. 8A

Cadena pesada

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRRQAPGKGL 45
 30
 46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AED 90
 75
 91 TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSTVFPLAPSS 135
 120
 136 KSTSGGTAAALGCLVKDYFPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSS 180
 165
 181 GLYSSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK 225
 210
 226 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD²⁵⁵TLMSIRTPETVCVVVDS 270
 240
 271 HEDPEVKFNWYVVDGVEVHNAAKTKPREEQY³⁰⁰N³⁰⁰STYRVVSVLTVLHQD 315
 285
 316 WLN³³⁰GKEYCKVSNKALPAPIEK³⁴⁵TKAKGQPREPQVYTLPPSREE 360
 330
 361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPPVLDS³⁹⁰DG 405
 375
 406 SFFPLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 449
 420
 435

FIG. 8B

1	V	H	S	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	V	S	I	G	V	A	W	Y	Q	K	P	G	K	45	
46	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	Y	R	Y	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	90
91	C	Q	Q	Y	I	Y	P	Y	T	F	G	Q	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	135			
136	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	180	
181	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C					217				

(SEQ ID NO. 23)

FIG. 9A

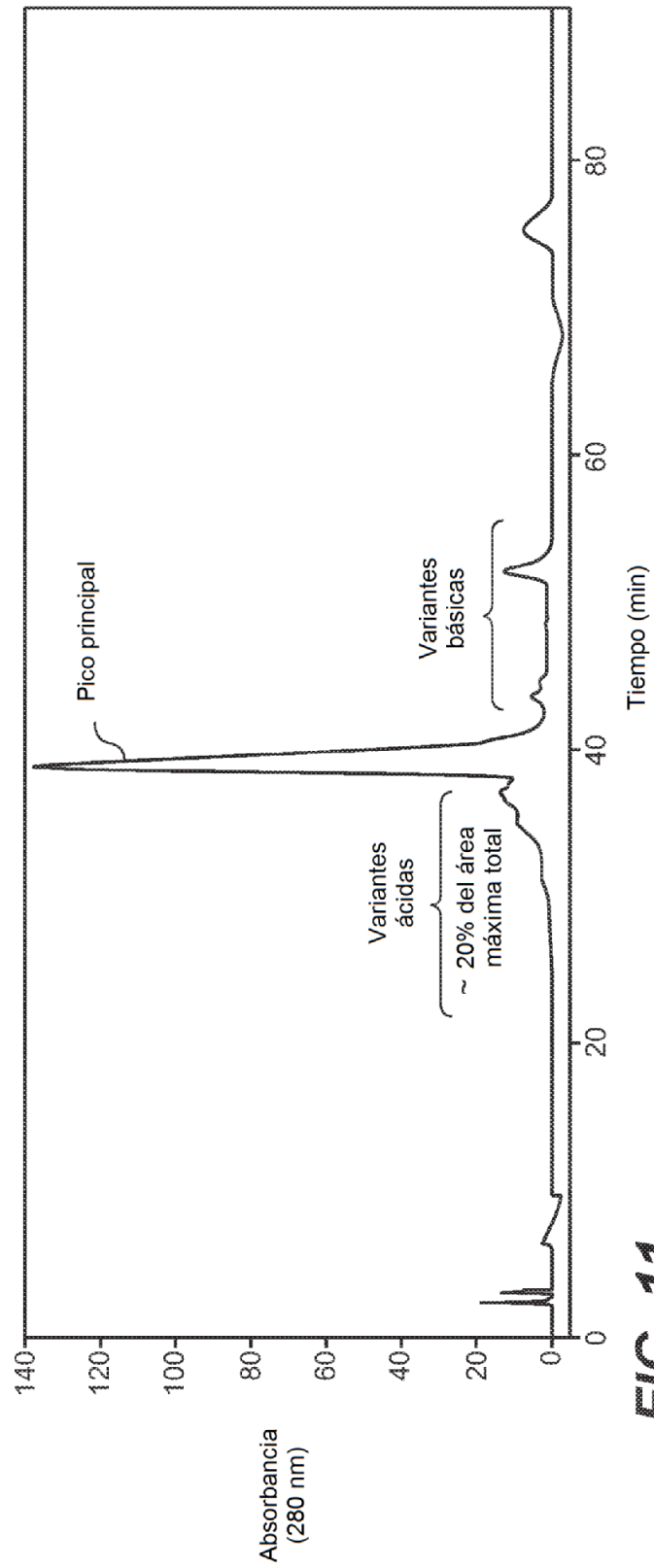
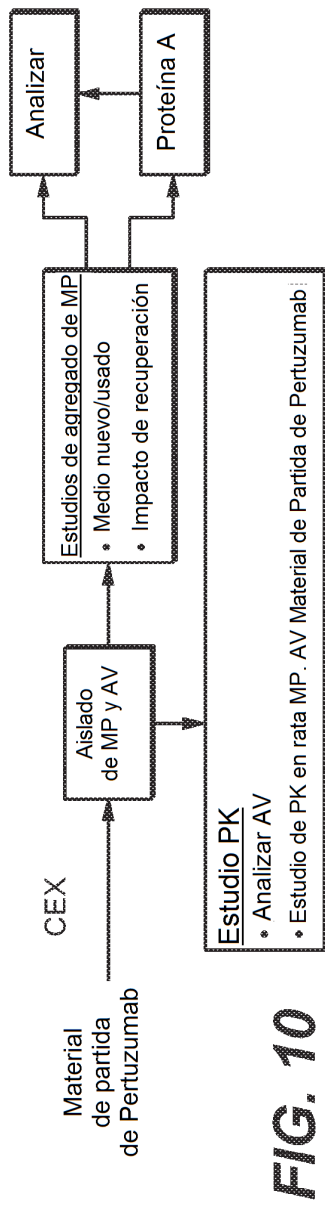
```

1   EVQLVESGGGLVQPFGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRRQAPGKGL      45
46  EWVA DVNPN SGGSIY NQRFFKGRFTLSVD RSKNTLYLQMN S LRAED      90
91  TAVYYCARNLG P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G F S V F P L A P S S K      135
136 STSGGTAA L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G      180
181 L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T      225
226 H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H      270
271 E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W      315
316 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M      360
361 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S      405
406 F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K      449

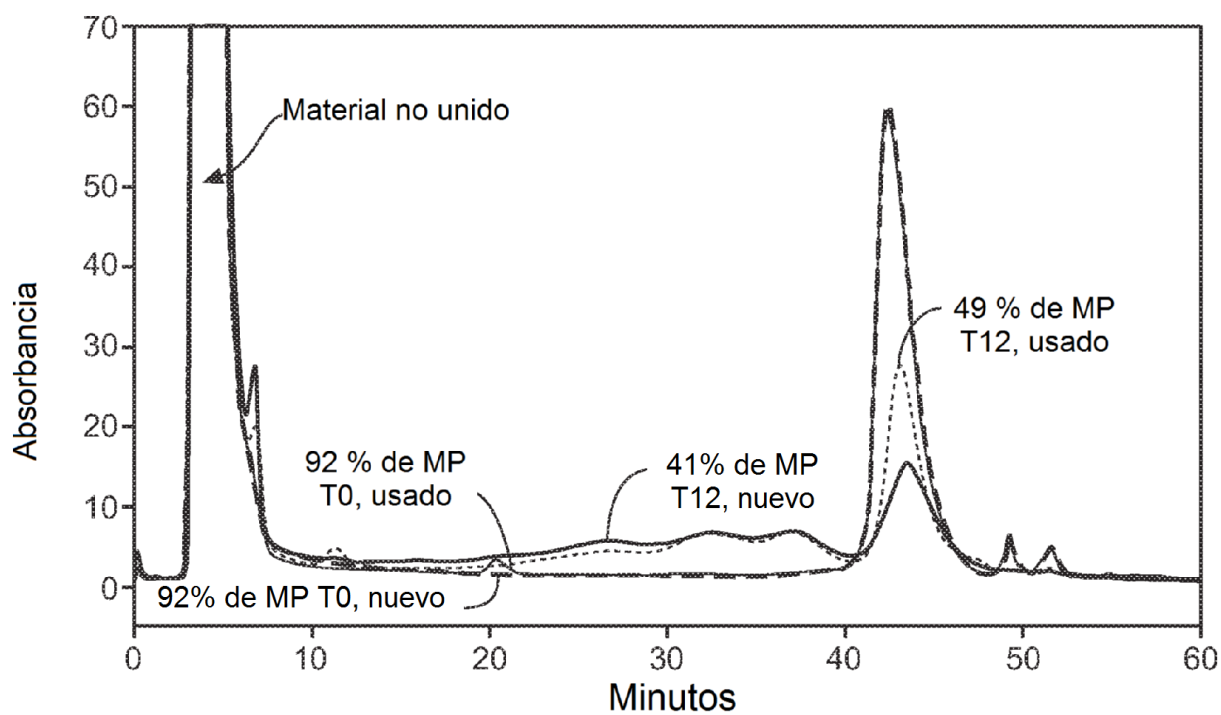
```

(SEQ ID NO. 24)

FIG. 9B



Análisis de material de partida de pertuzumab y fracciones CEX			
Análisis	Material de partida	Pico principal	Variantes ácidas
VEX (% de AV, % de MP, % de BV)	21, 68, 12	5, 93, 2	95, 4, 2
Potencia	94 (Prom. n=2)	109	92
SEC (% de monómero)	99,9	99,9	100

FIG. 12**FIG. 13**

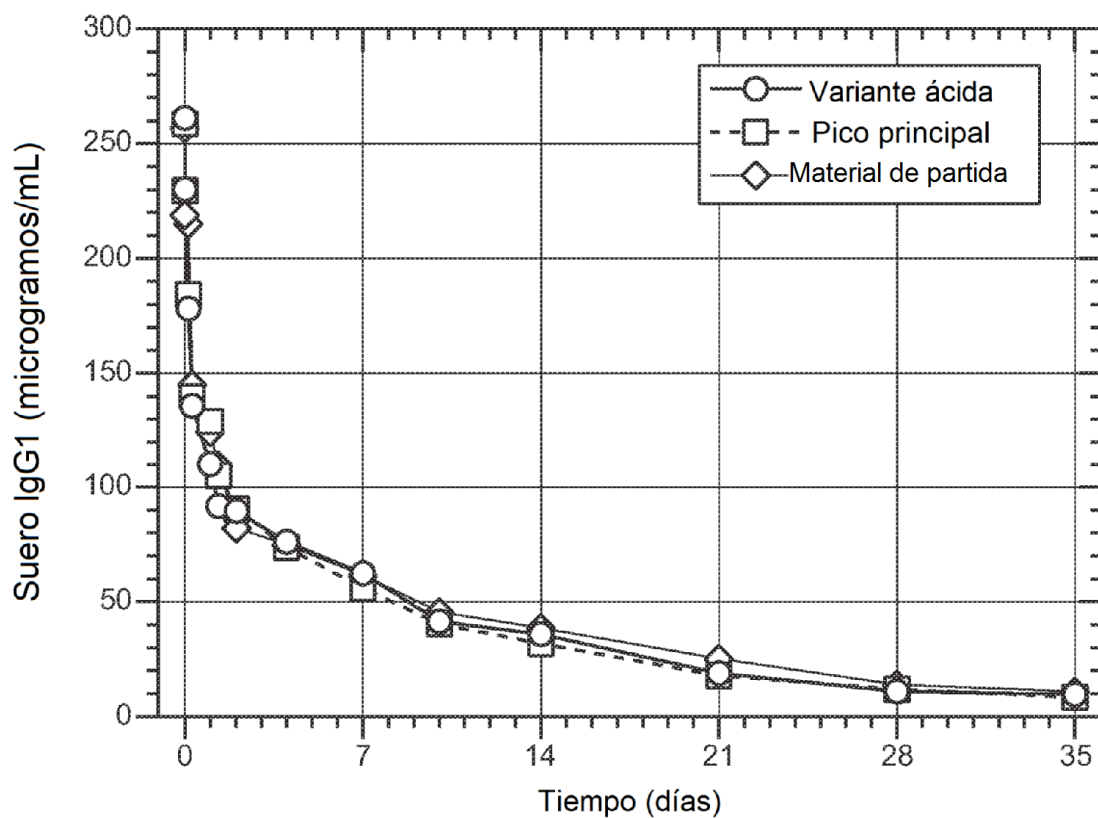
Condiciones de incubación de pico principal	
Condición de muestra de incubación de 12d	% de pico principal de CEX
Tiempo cero	90-92
Medio nuevo	41 %
Medio usado	49%
-Glucosa	43%
-Glucosa, -Peptona, -Pluronic	41 %
Medio nuevo + aislamiento de ProA	37 %
Tampón de medio	56 %

FIG. 14

Métodos para la caracterización de variantes ácidas	
Método	Variantes detectadas*
CEX +/- Tratamiento de sialidasa	6 % sialidado
CE-SDS reducido	1,5 % reducido de forma incompleta
CE-SDS no reducido	6 % de disulfuro reducido
Cromatografía de boronato	3,5 % glicada (orden superior)
Mapa peptídico	Deamidado

* Porcentaje del área máxima de CEX total.

FIG. 15

**FIG. 16**

AUC y relaciones medias geométricas del estudio de PK			
Material de ensayo (n=12 para cada grupo)	AUC ₀₋₁₄ (Día * µg/mL)		Relación media geométrica (CI)
	Media ± SD	Media geométrica	
Variante ácida	910 ± 73,1	907	0,963 (0,905, 1,03)
Pico principal	895 ± 85,5	891	0,946 (0,884, 1,01)
Material de partida de pertuzumab	946 ± 94,6	942	NA

FIG. 17