

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 379**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2011 PCT/IB2011/054835**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12059858**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2011 E 11837656 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2635605**

54 Título: **Anticuerpos anti-HER3 y composiciones**

30 Prioridad:

06.09.2011 US 201161531407 P

05.09.2011 DK 201100672

01.11.2010 US 408782 P

01.11.2010 DK 201000988

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2018

73 Titular/es:

SYMPHOGEN A/S (100.0%)

Pederstrupvej 93

2750 Ballerup, DK

72 Inventor/es:

PEDERSEN, MIKKEL, WANDAHL;

JACOBSEN, HELLE y

KOEFOED, KLAUS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 692 379 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-HER3 y composiciones

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos recombinantes que se dirigen al receptor HER3, y a las composiciones que comprenden dos o más de estos anticuerpos para su uso en la terapia contra el cáncer humano.

Antecedentes de la invención

Familia de los receptores EGFR

10 La familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (también conocida como la familia de ErbB) es un subgrupo de las tirosina cinasas receptoras (RTKs) y consiste en cuatro miembros: HER1/EGFR/ErbB, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 y HER4/ErbB4. Los miembros de la familia de EGFR son glucoproteínas modulares de cadena sencilla estrechamente relacionadas con una región de unión al ligando extracelular, un único dominio transmembránico y una tirosina cinasa intracelular (revisado en Ferguson (2008) *Annu Rev Biophys.* 37: 353-373). En ambientes fisiológicos normales, la familia de ErbB regula los eventos clave en la coordinación del crecimiento, diferenciación y migración celulares Citri et al. (2006) *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 505-516). Se cree que EGFR, HER2 y
 15 HER3 juegan papeles cruciales en la transformación maligna de las células normales y en el crecimiento continuo de las células cancerosas (vía de pro-supervivencia). Se ha encontrado que EGFR y HER2 son sobreexpresados por muchos cánceres epiteliales (Slamon et al. (1987) *Science*, 235: 177-182; Arteaga (2002) *Oncologist* 7 Supl. 4: 31-39; Bodey et al. (1997) *Anticancer Res.* 17: 1319-1330; Rajkumar et al. (1996) *J Pathol.* 179: 381-385). La sobreexpresión de EGFR y HER2 ha estado vinculada además a la progresión de la enfermedad, a supervivencia
 20 reducida, pobre respuesta y resistencia a la quimioterapia en varios cánceres epiteliales humanos (Slamon et al. (1987) más arriba; Baselga et al. (2002) *Oncologist* 7 Supl 4: 2-8).

Estructura de HER3

25 El tercer miembro de la familia de ErbB, conocido como el receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3, ErbB3), fue identificado en 1989 por Kraus et al. (*Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9193-9197). El gen HER3 codifica una proteína de 1342 aminoácidos con sorprendentes similitudes estructurales con EGFR y HER2. Las características tales como el tamaño completo, cuatro subdominios extracelulares (I-IV) con dos grupos de cisteína (dominios II y IV), y un dominio de tirosina cinasa, muestran similitudes estructurales con EGFR y HER2 (Cho y Leahy (2002) *Science*, 297: 1330-1333). El dominio de tirosina cinasa de HER3 muestra 59% de homología
 30 secuencial con el dominio de tirosina cinasa de EGFR (Brennan et al. (2000) *Oncogene*, 19: 6093-6101).

Regulación de la activación de HER3

35 El factor de diferenciación neu (NDF), la herregulina (HRG) y neuregulina 1 (NRG1) son sinónimos para la glucoproteína que es un ligando para HER3 (Peles et al. (1992) *Cell*, 69: 205-216; Wen et al. (1992) *Cell*, 69: 559-572). Al menos 15 isoformas de la proteína NRG1 han sido identificadas. Las isoformas son producidas a partir del único gen NRG1 a través de ajuste y múltiples promotores (Falls et al. (2003) *Exp Cell Res.* 284: 14-30). Tres características estructurales se aplican para las diferencias funcionales de las isoformas. Estas características
 40 estructurales son el tipo de dominio similar de EGF (α o β), la secuencia N-terminal (tipo I, II o III), y si la isoforma es o no inicialmente sintetizada como una proteína transmembránica o no membránica (Falls et al. (2003) más arriba). El subgrupo del tipo I de las isoformas de NRG1 tienen una secuencia N-terminal única seguida de un dominio similar a la inmunoglobulina y luego un dominio similar a EGF. Las variantes de tipo II contienen una secuencia similar a kringle N-terminal, el dominio de inmunoglobulina y el dominio similar a EGF. Las variantes de tipo III
 45 contienen un dominio hidrófobo N-terminal dentro de una región rica en cisteína, omiten el dominio de inmunoglobulina, y luego continúan dentro del dominio similar a EGF y diversos exones alternativos con dirección 3'. En dirección 3' desde el dominio similar a EGF, la isoforma de NRG1 puede contener una secuencia enlazadora, un dominio transmembránico y una cola citoplásmica (Falls et al. (2003) más arriba). Algunas de las isoformas de NRG1 son sometidas a glucosilación en la región espaciadora entre el dominio similar a inmunoglobulina y el dominio similar a EGF (Hayes et al. (2008) *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 13: 205-214).

50 Como es el caso para EGFR, HER3 existe en una conformación trabada y en una conformación extendida. En la conformación trabada, el brazo de dimerización es enterrado por interacciones con dominio IV, dejando los dominios I y III demasiado separados para la unión eficiente del ligando (Cho y Leahy et al. (2002) más arriba). La unión del ligando a los dominios extracelulares I y III ocurre en la conformación extendida de HER3 y conduce a la heterodimerización con otros miembros de la familia de ErbB (u otros miembros de RTK, por ejemplo MET), heterodimerizándose preferentemente la molécula de HER3 extendida y unida al ligando con HER2 (Pinkas-Kramarski et al. (1996) *EMBO J*, 15: 2452-2467). No se forman homodímeros de HER3 después de la unión del
 55 ligando (Ferguson et al. (2000) *EMBO J*, 19: 4632-4643).

En contraste con EGFR y HER2, la tirosina cinasa de HER3 tiene actividad catalítica deteriorada, insuficiente para cualquier respuesta biológica detectable Pinkas-Kramarski et al. (1996) más arriba; Guy et al. (1994) *Proc Natl Acad*

Sci USA, 91: 8132-8136). Dos restos de aminoácidos que están altamente conservados en los dominios catalíticos de las proteína cinasas (Hanks et al. (1988) Science, 241: 42-52) están alterados en el dominio catalítico de HER3. Estos son la sustitución de la asparagina por ácido aspártico en el resto 815 y la sustitución de la histamina por glutamato en el resto 740. Las dos sustituciones de aminoácidos pueden ser la razón por la que HER3 carece de actividad catalítica de su dominio de tirosina cinasa (Plowman et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA, 87: 4905-4909). Debido a la actividad de cinasa intrínseca deteriorada de HER3, el receptor necesita heterodimerizarse con otro miembro de la familia de ErbB con el fin de responder a su propia unión del ligando (Berger et al. (2004) FEBS Lett, 569: 332-336).

Terminación de la señalización de HER3

Se sabe poco respecto a la endocitosis de HER3. Además, diferentes estudios han sugerido que HER3 tiene endocitosis deteriorada en el mismo grado que HER2 (Baulida et al. (1996) J Biol Chem, 271: 5251-5257). En concordancia con esto, se encontró que el complejo de HER3-NRG1 es internalizado menos eficiente y más lentamente que el complejo de EGFR-EGF, apoyando que HER3 no es sometido a endocitosis tan eficientemente como EGFR (Baulida et al. (1997) Exp Cell Res, 232: 167-172; Waterman et al. (1999) EMBO J, 18: 3348-3358). Sin embargo, cuando la cola C-terminal de EGFR fue reemplazada por la cola C-terminal de HER3, EGFR sufrió endocitosis deteriorada, sugiriendo que una región en el término C de HER3 protege al receptor contra internalización (Waterman et al. (1999) más arriba). Se ha sugerido también que NRG1 no se dirige eficientemente a HER3 para la degradación debido a la disociación de los complejos ligando-receptor en los endosomas, como se observa cuando EGF es activado por TGF α (Waterman et al. (1999) más arriba).

Expresión y papel fisiológico de HER3

Se ha mostrado que HER3, al igual que EGFR y HER2, es importante en el desarrollo de la glándula mamaria (Schroeder et al. (1998) Cell Growth Differ, 9: 451-464). Mientras que EGFR y HER2 son expresados de forma importante y están colocalizados en la glándula mamaria de ratón pubescente, HER3 solamente es expresado en niveles bajos en glándulas mamarias postpubescentes de ratones vírgenes, pero es expresado en niveles más elevados durante el embarazo y lactancia (Schroeder et al. (1998) más arriba). Los mayores niveles de expresión de HER3 durante el embarazo y la lactancia implican la importancia de HER3 en las etapas tardías del desarrollo y diferenciación de las glándulas mamarias (Jackson-Fisher et al. (2008) Breast Cancer Res, 10: R96). Estudios con ratones deficientes en HER3 indicaron además el papel regulador de HER3 en la morfogénesis del epitelio mamario a través de la ruta de señalización de PI3K/AKT (Jackson-Fisher et al. (2008) más arriba). Otros estudios mostraron niveles elevados de expresión de HER3 por células epiteliales ductales en ratas hacia el día 14-16 de embarazo, demostrando también el papel regulador de HER3 en la morfogénesis del epitelio mamario (Darcy et al. (2000) J Histochem Cytochem, 48: 63-80).

La supresión dirigida del gen HER3 en ratones dio como resultado letalidad embrionaria en el día 13,5, debido a que las válvulas cardíacas subdesarrolladas fueron incapaces de soportar la función cardíaca apropiada debido a reflujo sanguíneo (Erickson et al. (1997) Development, 124: 4999-5011). Otros defectos incluyen anomalías en el desarrollo cerebral, especialmente en la región mesencefálica, incluyendo el cerebelo, y defectos graves en las células de Schwann de axones periféricos de neuronas sensoriales y motoras (Erickson et al. (1997) más arriba; Riethmacher et al. (1997) Nature, 389: 725-730).

Estudios *in vitro* también han implicado a HER3, en combinación con HER2, en el desarrollo de queratinocitos (Marikovsky et al. (1995) Oncogene, 10: 1403-1411), precursores de células de Schwann (Syroid et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA, 93: 9229-9234), oligodendrocitos (Vartanian et al. (1997) J Cell Biol, 137: 211-220) y la sinapsis neuromuscular (Zhu et al. (1995) EMBO J, 14: 5842-5848).

La distribución tisular de HER3 no es muy diferente de la de EGFR (www.proteinatlas.org). A pesar de la actividad alterada de cinasa de HER3, el receptor desempeña un papel esencial en la red de ErbB a través de la señalización de PI3K/AKT (Citri et al. (2003) Exp Cell Res, 284: 54-65). Debido al requisito de heterodimerización para el inicio de la señalización, el papel fisiológico de HER3 puede asemejarse en conjunto a los identificados para EGFR y HER2. El papel preciso de HER3 en los adultos humanos es desconocido, sin embargo, debido a la letalidad embrionaria de la supresión de HER3 en ratones y a los escasos datos sobre la inhibición de HER3.

HER3 y cáncer

HER3 es único en su capacidad para canalizar la señalización de ErbB hacia la ruta de señalización de PI3K/AKT, lo que favorece el crecimiento y progresión tumorales (Prigent et al. (1994) EMBO J, 13: 2831-2841). El papel crítico de HER3 en la regulación del crecimiento tumoral también está apoyado por la observación de que la sobreexpresión de HER2 en cáncer de mama humano está asociada a menudo con mayores niveles de expresión de HER3 (Naidu et al. (1998) Br J Cancer, 78: 1385-1390). Además, la sobreexpresión de HRG da como resultado mayor transformación y tumorigenicidad (Atlas et al. (2003) Mol Cancer Res, 1: 165-175), mientras que el bloqueo de NRG inhibe la tumorigenicidad y metástasis (Tsai et al. (2003) Oncogene, 22: 761-768), indicando la importancia de la presencia de un ligando de HER3 para el desarrollo del cáncer.

La presencia de homodímeros de HER2 en la superficie celular, y de ese modo la exageración de la señalización de HER2, causa transformación de células epiteliales (revisado en Yarden y Sliwkowski (2001) Nat Rev Mol Cell Biol, 2: 127-137). Sin embargo, el dímero de HER2-HER3 tiene la capacidad para inducir transducción de señales a través tanto de la ruta de proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK) como de AKT. La activación tanto de la ruta de MAPK como de la ruta de AKT implica el potencial oncogénico adicional de heterodímero de HER2-HER3 en comparación con el homodímero de HER2 (revisado en Citri et al. (2003) más arriba).

Se encuentra expresión elevada de HER3 en muchos de los mismos tipos de tumores que sobreexpresan HER2, incluyendo cáncer de vejiga y colorrectal, además del cáncer de mama (Bodey et al. (1997) Anticancer Res, 17: 1319-1330; Rajkumar et al. (1996) J Pathol, 179: 381-385; Lemoine et al. (1992) Br J Cancer, 66: 1116-1121; Maurer et al. (1998) Hum Pathol, 29: 771-777). Aunque son necesarios más estudios para establecer la asociación entre la sobreexpresión de HER3 y el resultado clínico, las indicaciones clínicas apoyan los resultados de los estudios *in vitro* de que ni HER2 ni HER3 pueden ser considerados como receptores independientes en relación con el cáncer.

Anticuerpos anti-HER3

En la bibliografía se ha descrito un número de anticuerpos anti-HER3. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 2011/060206, WO 2011/044311, WO 2011/022727, WO 2010/127181, WO 2008/100624, WO 2007/077028, WO 03/013602 y WO 97/35885.

AMG 888 (Amgen/Dallchi Sankyo) es un anticuerpo monoclonal totalmente humano que se afirma que inhibe la señalización oncogénica de HER3 humano. AMG 888 está siendo actualmente investigado en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer.

MM-121 (Merrimack Pharmaceuticals) es un anticuerpo anti-HER3 que se afirma que bloquea la unión de heregulina a, y por tanto la activación de, HER3; véanse el documento WO 2010/019952 y Schoeberl et al., Cancer Res. 70(6):2485-94, marzo 2010. MM-121 está siendo también actualmente investigado en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer.

Pertuzumab es un anticuerpo anti-HER2 que funciona como un inhibidor de la dimerización de HER, que inhibe la dimerización de HER2 a HER3 y a los otros receptores de EGFR. Franklin et al. (Cancer Cell 2004, 5(4):317-28) describen que pertuzumab une HER2 cerca del centro del dominio II, bloqueando estéricamente un bolsillo de unión necesario para la heterodimerización y señalización de HER2-HER3. La secuencia de aminoácidos de pertuzumab se describe en los documentos WO 2006/033700 y US 2006/0121044 A1.

A pesar del hecho de que se conocen ciertos anticuerpos anti-HER3, y en algunos casos están siendo investigados en ensayos clínicos, actualmente no hay anticuerpos anti-HER3 aprobados para uso terapéutico. En vista del papel crítico de HER3 en la regulación del crecimiento tumoral como se esquematiza anteriormente, existe por lo tanto la necesidad de nuevos anticuerpos dirigidos contra el receptor HER3, así como mezclas de tales anticuerpos anti-HER3.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición de anticuerpos que comprende al menos una primera y una segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 humano que se unen a distintos epítomos de HER3, en la que:

a) dicha primera molécula de anticuerpo anti-HER3 humano comprende CDR1-3 de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 48, 57, y 58, respectivamente, y CDR1-3 de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 76, YTS, y SEQ ID NO: 77, respectivamente; y

b) dicha segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 humano comprende CDR1-3 de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 54, 55, y 56, respectivamente, y CDR1-3 de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, HTS, y SEQ ID NO: 75, respectivamente.

En una realización, la composición de anticuerpos comprende al menos una primera y una segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 humano que se unen a distintos epítomos de HER3, en la que:

a) la primera molécula de anticuerpo anti-HER3 humano comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, y una cadena ligera que comprende el dominio variable de cadena ligera en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; o una variante humanizada de los mismos; y

b) la segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 humano comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y una cadena ligera que comprende el dominio variable de cadena ligera en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o una variante humanizada de los mismos.

En una realización adicional, la composición de anticuerpos comprende al menos una primera y una segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 humano que se unen a distintos epítomos de HER3, en la que:

- 5 a) la primera molécula de anticuerpo anti-HER3 humano comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; o una variante humanizada de los mismos; y
- 10 b) la segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 humano comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o una variante humanizada de los mismos.

En una realización, la composición de anticuerpos comprende además una tercera molécula de anticuerpo anti-HER3 humano, distinta de las moléculas de anticuerpo primera y segunda.

En una realización, al menos una molécula de anticuerpo anti-HER3 humano en dicha composición es un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-HER3 humano conjugado a un agente contra el cáncer.

- 15 Se proporciona además una molécula de unión biespecífica que se une a HER3, que comprende las CDR1-3 de cadena pesada y ligera de las moléculas de anticuerpo primera y segunda de la composición de anticuerpos de la invención.

20 También se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de una molécula de anticuerpo de la composición proporcionada. La invención también se refiere a un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico.

En una realización, la invención se refiere a una estirpe celular policlonal capaz de expresar la composición de anticuerpos de la invención, en la que dicha estirpe celular policlonal comprende células hospedantes capaces cada una de expresar un anticuerpo anti-HER3 humano de la composición.

- 25 También se proporciona un método para producir una composición de anticuerpos que comprende al menos dos moléculas de anticuerpo recombinante anti-HER3 humano, comprendiendo el método:

- 30 a) proporcionar al menos una primera célula hospedante y una segunda célula hospedante, en el que la primera célula hospedante es capaz de expresar la primera molécula de anticuerpo anti-HER3 humano de la composición de la invención, y la segunda célula hospedante es capaz de expresar la segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 humano de la composición de la invención;
- b) cultivar dichas células hospedantes en condiciones adecuadas para la expresión de las moléculas de anticuerpo; y
- c) aislar las moléculas de anticuerpo.

En una realización, las células hospedantes se cultivan en un solo biorreactor.

- 35 Se proporcionan además composiciones farmacéuticas que comprenden la composición de la invención o la molécula biespecífica de la invención y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. También se proporciona la composición farmacéutica para uso en la prevención, tratamiento o mejora de uno o más síntomas asociados con cáncer en un paciente humano, para uso en el tratamiento de cáncer o un trastorno caracterizado por la expresión de HER3 en un paciente humano, y para uso en el tratamiento de cáncer caracterizado por la sobreexpresión de HER3 en un paciente humano.
- 40

45 La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos recombinantes dirigidos contra el receptor HER3, así como composiciones que comprenden dos o más de estos anticuerpos, y a los anticuerpos y composiciones de la invención para uso en terapia contra el cáncer humano, por ejemplo para el tratamiento de cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer gástrico u otros cánceres que expresan o sobreexpresan HER3, o que tienen una signatura de activación de la ruta de HER3 (por ejemplo NSCLC, glioblastoma). En comparación con los tratamientos actualmente disponibles para tales cánceres, incluyendo anticuerpos monoclonales disponibles dirigidos contra otros receptores de la familia de EGFR, se contempla que los anticuerpos de la invención pueden proporcionar una respuesta clínica superior ya sea solos o, preferiblemente, en una composición que comprende dos o más de tales anticuerpos, y opcionalmente en combinación con otros tratamientos tales como quimioterapia.

- 50 Se discuten además nuevos anticuerpos recombinantes anti-HER3 basados en los anticuerpos citados aquí como los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259, así como sus variantes humanizadas y/o maduradas por afinidad. También se describe una molécula de anticuerpo recombinante anti-HER3 que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos citados aquí como los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259.

5 Se describe además una molécula de anticuerpo recombinante anti-HER3 que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada y la secuencia de CDR3 de cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259, y que compite por la unión con dicho anticuerpo; una molécula de anticuerpo recombinante anti-HER3 que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de uno cualquiera de estos anticuerpos; y un anticuerpo recombinante anti-HER3 que comprende la secuencia de la región variable de cadena pesada y la secuencia de la región variable de cadena ligera de uno cualquiera de estos anticuerpos, o que comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada y una secuencia de la región variable de cadena ligera que tiene cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia, con las secuencias de la región variable de cadena pesada y de la región variable de cadena ligera, respectivamente, de uno cualquiera de estos anticuerpos, y que compite por la unión con dicho anticuerpo.

15 También se describe una composición de anticuerpos recombinantes, que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3, en la que los anticuerpos primero y segundo se unen a distintos epítopos de HER3, y en la que uno o ambos de los anticuerpos primero y segundo se seleccionan del grupo de los anticuerpos resumidos anteriormente.

20 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo recombinante anti-HER3 de la invención conjugado a un agente contra el cáncer. Un aspecto relacionado se refiere a composiciones que comprenden al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3 de la invención, en las que al menos un anticuerpo anti-HER3 en dicha composición es un inmunoconjugado.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo anti-HER3 de la invención, así como vectores de expresión que comprenden tal polinucleótido, y a células hospedantes que se han transfectado con tal vector de expresión.

25 Todavía un aspecto adicional de la invención se refiere a métodos para producir anticuerpos y composiciones de anticuerpos policlonales de la invención.

30 Todavía un aspecto adicional de la invención se refiere a anticuerpos y composiciones para uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto humano o animal, en particular el tratamiento de cáncer en seres humanos, administrando un anticuerpo anti-HER3 o una composición de la invención a dicho sujeto. También se describe el uso de uno o más anticuerpos anti-HER3 de la invención para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de una enfermedad en un ser humano o animal, en particular para el tratamiento de cáncer en seres humanos.

También se describe un método para inducir la internalización de HER3 en la superficie de células que expresan o sobreexpresan HER3, comprendiendo el método poner en contacto las células con un anticuerpo recombinante anti-HER3 o un inmunoconjugado o una composición de anticuerpos recombinantes anti-HER3 de la invención.

35 Aspectos adicionales de la invención y realizaciones particulares serán manifiestos a partir de la descripción y ejemplos que siguen.

Descripción de los dibujos

Las Figuras 1-10 muestran la actividad metabólica de células MDA-MB-175 tratadas con diferentes concentraciones de los anticuerpos anti-HER3 indicados, durante 96 horas.

40 La Figura 11 muestra los resultados de los análisis de transferencia western de niveles de fosfo-HER3 en las estirpes celulares MDA-MB-175 y MCF7 tras 1 hora de pretratamiento con los anticuerpos indicados, seguido de la estimulación con 10 nM de heregulina beta.

Las Figuras 12-15 muestran la actividad metabólica de mezclas seleccionadas de dos anticuerpos anti-HER3 en cuatro estirpes de células cancerosas.

45 Las Figuras 16-19 muestran la actividad metabólica de mezclas seleccionadas de tres anticuerpos anti-HER3 en cuatro estirpes de células cancerosas.

Las Figuras 20 y 21 muestran la actividad inhibitoria del crecimiento de dos mezclas diferentes de dos anticuerpos anti-HER3, comparada con los anticuerpos individuales en las dos mezclas, en la estirpe de células cancerosas MDA-MB-175.

50 Las Figuras 22 y 23 muestran la actividad inhibitoria del crecimiento de una mezcla de dos anticuerpos anti-HER3 de la invención comparada con los anticuerpos de referencia MM-121 (anti-HER3) y pertuzumab (anti-HER2), en las dos estirpes de células cancerosas MDA-MB-175 y MCF7.

La Figura 24 es una transferencia western que muestra los niveles de HER3 a diversos tiempos en lisados de células completas de células OVCAR-8 tratadas con los anticuerpos anti-HER3 individuales 5082 o 5038, o una mezcla de los dos anticuerpos.

5 La Figura 25 es una transferencia western llevada a cabo sobre lisados de células completas de células MDA-MB-175, que muestra la inhibición de la fosforilación de HER3 y AKT a diversos tiempos por los anticuerpos anti-HER3 individuales 5082 o 5038, o una mezcla de los dos anticuerpos.

La Figura 26 muestra la eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti-HER3 individuales 5038 y 5082, y de la mezcla de 5038+5082, en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón A549.

10 Las Figura 27-32 muestran los resultados de un cartografiado de los dominios de anticuerpos anti-HER3 mediante titulación de los anticuerpos y controles negativos frente a antígenos de HER3 revestidos.

La Figura 33 muestra una tabla con los resultados de clasificación de epítomos de anticuerpos anti-HER3 mediante análisis de competición cruzada de anticuerpos.

La Figura 34 es una ilustración gráfica de la relación entre clasificaciones asignadas de epítomos para anticuerpos anti-HER3, en la que los círculos que solapan representan anticuerpos con epítomos que solapan.

15 La Figura 35 muestra la eficacia *in vivo* de los anticuerpos monoclonales anti-HER3 5038 y 5082 y la mezcla de 5038+5082 en el modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático BxPC3, expresada como volumen tumoral.

La Figura 36 muestra la eficacia *in vivo* de los anticuerpos monoclonales anti-HER3 5038 y 5082, y la mezcla de 5038+5082 en el modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático BxPC3, expresada como porcentaje de supervivencia.

20 Descripción detallada de la invención

Definiciones

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

35 Los términos “anticuerpo” o “anticuerpos”, como se utilizan en la presente, están también destinados a incluir los anticuerpos quiméricos y de cadena sencilla, así como los fragmentos de unión de los anticuerpos, tales como los fragmentos Fab, Fv o los fragmentos de Fv de cadena sencilla (scFv), así como las formas multiméricas tales como las moléculas de IgA dimericas o IgM pentavalente. Un anticuerpo puede ser de origen humano o no humano, por ejemplo un anticuerpo murino o derivado de otro roedor, o un anticuerpo quimérico, humanizado o reconformado basado, por ejemplo, en un anticuerpo murino.

40 Cada cadena pesada de un anticuerpo incluye típicamente una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada incluye típicamente tres dominios, denominados CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera de anticuerpo incluye típicamente una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera incluye típicamente un único dominio, denominado CL. Las regiones VH y VL pueden ser además subdivididas en regiones de hipervariabilidad (“regiones hipervariables”, las cuales pueden ser hipervariables en secuencia y/o en bucles estructuralmente definidos). Estas son también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), las cuales están intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FRs). Cada VH y VL incluye típicamente tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el término amino hasta el término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Los restos de aminoácidos en las regiones variables son a menudo numerados utilizando un método de numeración estandarizado conocido como el esquema de numeración de (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

55 En el listado de secuencias anexo, el ADN de cadena ligera (LC) y las secuencias de aminoácidos incluyen la secuencia de la región variable de cadena ligera (VL) y la secuencia de la región constante kappa humana. Como se menciona más adelante en el Ejemplo 1, la región constante kappa humana comienza con los aminoácidos -TVAAP-

(Thr Val Ala Ala Pro) y termina en el C-terminal con los aminoácidos - NRGEC (Asn Arg Gly Glu Cys). Por lo tanto, como se utiliza en la presente, los términos “secuencia de la región variable de cadena ligera” o “VL” se entienden que se refieren a la parte N-terminal de una secuencia de cadena ligera en el listado de secuencias antes del inicio de la región constante kappa humana (es decir, antes de los aminoácidos TVAAP).

5 Los números de anticuerpos utilizados en la presente en el contexto de los anticuerpos completos, por ejemplo “anticuerpos 5082”, se refieren a los anticuerpos específicos descritos en los ejemplos y definidos en el listado de secuencias anexo. Por ejemplo, el anticuerpo 5082 es un anticuerpo con una cadena pesada que comprende la secuencia de la región variable de cadena pesada descrita en la SEQ ID NO: 18 y la secuencia de la región constante de cadena pesada de IGHG1 descrita en la SEQ ID NO: 44, y una cadena ligera con la secuencia de aminoácido descrita en la SEQ ID NO: 20, en la que la secuencia de cadena ligera como se explicó anteriormente incluye la secuencia de la región variable de cadena ligera (restos 1-108 en la SEQ ID NO: 20) y la secuencia de la región constante kappa humana (restos 109-214 en la SEQ ID NO: 20).

15 La descripción también proporciona anticuerpos que “derivan de” o “se basan en” un anticuerpo específico descrito en la presente, en el que tal anticuerpo comprende, dependiendo del contexto particular, una de las siguientes: la secuencia de CDR3 de cadena pesada de dicho anticuerpo especificado; la secuencia de CDR3 de cadena pesada y la secuencia de CDR3 de cadena ligera de dicho anticuerpo especificado; las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de dicho anticuerpo especificado; o la secuencia de la región variable de cadena pesada y la secuencia de la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo especificado, o una variante humanizada y/o con madurez de la afinidad de dicha secuencia de la región variable de cadena pesada y/o secuencia de la región variable de cadena ligera, o una secuencia de la región variable de cadena pesada y/o de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia, con las secuencias de la región variable de cadena pesada y de la región variable de cadena ligera. Un anticuerpo que es derivado de o basado en un anticuerpo especificado descrito en la presente en general se unirá al mismo epítipo de HER3 como anticuerpo especificado, y mostrará preferentemente sustancialmente la misma actividad que el anticuerpo especificado. Se considera que un anticuerpo se une al mismo epítipo de HER3 que el anticuerpo especificado si éste compite por la unión con dicho anticuerpo especificado.

20 La especificidad de una interacción del anticuerpo con un antígeno diana radica principalmente en los restos de aminoácidos localizados en las seis CDRs de la cadena pesada y ligera. Las secuencias de aminoácidos dentro de las CDRs son por lo tanto mucho más variables entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDRs. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de un anticuerpo de origen natural específico, o más en general cualquier anticuerpo específico con una secuencia de aminoácidos dada, construyendo vectores de expresión que expresan las secuencias de CDR provenientes del anticuerpo específico injertadas dentro de las secuencias estructurales provenientes de un anticuerpo diferente. Como resultado, es posible “humanizar” un anticuerpo no humano y todavía mantener sustancialmente la especificidad y la afinidad de unión del anticuerpo original. Una discusión más detallada de la humanización es proporcionada más adelante.

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

30 El término “humanizar” se refiere al hecho de que cuando un anticuerpo es total o parcialmente de origen no humano, por ejemplo un anticuerpo murino obtenido a partir de la inmunización de ratones con un antígeno de interés, o un anticuerpo quimérico basado en tal anticuerpo murino, es posible sustituir ciertos aminoácidos, en particular en las regiones estructurales y dominios constantes de las cadenas pesada y ligera, a fin de evitar o minimizar una respuesta inmune en seres humanos. Se sabe que todos los anticuerpos tienen el potencial para provocar una respuesta humana anti-anticuerpo, que se correlaciona en cierto grado con el grado de “humanidad” del anticuerpo en cuestión. Aunque no es posible predecir de forma precisa la inmunogenicidad, y de ese modo la respuesta humana anti-anticuerpo de un anticuerpo particular, los anticuerpos no humanos tienden a ser más inmunógenos que los anticuerpos humanos. Los anticuerpos quiméricos, en los que las regiones constantes extrañas (habitualmente de roedor) se han sustituido por secuencias de origen humano, han mostrado ser generalmente menos inmunógenos que los anticuerpos de origen totalmente extraño, y la tendencia en anticuerpos terapéuticos es hacia los anticuerpos humanizados o totalmente humanos. Para anticuerpos quiméricos u otros anticuerpos de origen no humano, se prefiere por lo tanto que se humanicen para reducir el riesgo de una respuesta humana anti-anticuerpo.

Para anticuerpos quiméricos, la humanización implica típicamente modificar las regiones estructurales de las secuencias de las regiones variables. Los restos de aminoácidos que son parte de una región determinante de la complementariedad (CDR) típicamente no se alterarán en relación con la humanización, aunque en ciertos casos puede ser deseable alterar restos de aminoácidos de la CDR individuales, por ejemplo eliminar un sitio de glucosilación, un sitio desamidación, o un resto de cisteína indeseado. La glicosilación enlazada a través de N se produce mediante unión de una cadena de oligosacárido a un resto de asparagina en la secuencia tripeptídica Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. La eliminación de un sitio de N-glicosilación se puede lograr mutando el resto Asn o el Ser/Thr por un resto diferente, preferiblemente por medio de sustitución conservativa. La desamidación de los restos de asparagina y glutamina puede producirse dependiendo de factores tales como pH y exposición de la superficie. Los restos de asparagina son particularmente susceptibles a la desamidación, principalmente cuando están presentes en la secuencia Asn-Gly, y en menor grado en otras secuencias dipeptídicas tales como Asn-Ala. Cuando tal sitio de desamidación, en particular Asn-Gly, está presente en una secuencia de CDR, es deseable por lo tanto eliminar el sitio, típicamente mediante sustitución conservativa, para eliminar uno de los restos implicados.

En la técnica se conocen numerosos métodos para la humanización de una secuencia de anticuerpo; véase, por ejemplo, el repaso de Almagro y Fransson (2008) *Front Biosci.* 13: 1619-1633. Un método usado habitualmente es el injerto de CDR, que, por ejemplo para un anticuerpo quimérico derivado de murino, implica identificar contrapartes del gen de línea germinal humano con respecto a los genes de la región variable murinos, e injertar las secuencias de CDR murinas en la región estructural. El injerto de CDR se puede basar en las definiciones de CDR de Kabat, aunque una publicación reciente (Magdelaine-Beuzelin et al. (2007) *Crit Rev. Oncol Hematol.* 64: 210-225) ha sugerido que la definición de IMGT (www.imgt.org) puede mejorar el resultado de la humanización. Puesto que el injerto de CDR puede reducir la especificidad y afinidad de unión, y de este modo la actividad biológica, de un anticuerpo no humano con CDR injertada, se pueden introducir retromutaciones en posiciones seleccionadas del anticuerpo con CDR injertada, a fin de retener la especificidad y afinidad de unión del anticuerpo progenitor. La identificación de posiciones para posibles retromutaciones se puede llevar a cabo usando información disponible en la bibliografía y en bases de datos de anticuerpos. Los restos de aminoácidos que son candidatos para las retromutaciones son típicamente aquellos que están situados en la superficie de una molécula de anticuerpo, mientras que los restos que están enterrados o que tienen un grado bajo de exposición en la superficie no se alterarán normalmente. Una técnica de humanización alternativa al injerto de CDR y la retromutación es la reconformación de la superficie, en la que se retienen los restos de origen no humano no expuestos en la superficie, mientras que los restos en la superficie se alteran a restos humanos.

En ciertos casos, también puede ser deseable alterar uno o más restos de aminoácidos de la CDR a fin de mejorar la afinidad de unión por el epítipo diana. Esto es conocido como “maduración de la afinidad” y opcionalmente se puede llevar a cabo en relación con la humanización, por ejemplo en situaciones en las que la humanización de un anticuerpo conduce a especificidad o afinidad de unión reducidas y no es posible mejorar suficientemente la especificidad o afinidad de unión mediante retromutaciones solas. En la técnica se conocen diversos métodos de maduración de la afinidad, por ejemplo el método de mutagénesis por saturación por barrido *in vitro* descrito por Burks et al. (1997) *PNAS USA*, vol. 94, p. 412-417, y el método de maduración de la afinidad *in vitro* por etapas de Wu et al. (1998) *PNAS USA*, vol. 95, p. 6037-6042.

Como se señala anteriormente, la presente invención engloba anticuerpos humanizados, es decir, anticuerpos como se describen de otro modo que se han sometido a humanización. Éstos también se pueden denominar como “variantes humanizadas” de un anticuerpo de la invención. En particular, las expresiones “secuencia de la región variable de cadena pesada” y “secuencia de la región variable de cadena ligera”, como se usan aquí con referencia a cualquier secuencia de aminoácidos específica, pretenden englobar no solo esa secuencia específica, sino también cualquier variante humanizada de la misma. Las variantes con madurez de la afinidad de los anticuerpos anti-HER3 descritos aquí también están destinadas a estar englobadas por la presente invención.

Como se usa aquí, una referencia a una secuencia de la región variable de cadena pesada o una secuencia de la región variable de cadena ligera con un nivel mínimo particular de identidad de secuencia en comparación con una secuencia específica de la región variable de cadena pesada o de la región variable de cadena ligera, por ejemplo que tiene al menos 90% o al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia, pretende incluir, pero no se limita a, variantes humanizadas y/o con madurez de la afinidad de tal secuencia de referencia.

La expresión “anticuerpo recombinante” se refiere a un anticuerpo que es expresado a partir de una célula o estirpe celular transfectada con un vector de expresión (o posiblemente más de un vector de expresión, típicamente dos vectores de expresión) que comprende la secuencia codificante del anticuerpo, en el que dicha secuencia codificante no está asociada de forma natural con la célula.

El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico en la que se puede insertar una secuencia de ácido nucleico para el transporte entre diferentes entornos genéticos, y/o para la expresión en una célula hospedante. Un vector que porta elementos reguladores para la transcripción de la secuencia de ácido nucleico (al menos un promotor adecuado) se denomina como un “vector de expresión”. Los términos “plásmido” y “vector” se pueden usar

de forma intercambiable. Los vectores de expresión usados en el contexto de la presente invención pueden ser de cualquier tipo adecuado conocido en la técnica, por ejemplo un plásmido o un vector vírico.

Las expresiones “anticuerpo policlonal” o “mezcla de anticuerpos [monoclonales]” se refieren a una composición de dos o más moléculas de anticuerpo diferentes que son capaces de unirse a o de reaccionar con determinantes antigénicos diferentes en los mismos antígenos o en antígenos diferentes. En el contexto de la presente invención, los anticuerpos individuales de un anticuerpo policlonal se unen a determinantes antigénicos diferentes de HER3. Preferiblemente, los anticuerpos individuales de un anticuerpo policlonal de la invención se unen a diferentes epítopos de HER3, más preferiblemente epítopos distintos y sustancialmente que no solapan. Generalmente se piensa que la variabilidad de un anticuerpo policlonal está situada en las regiones variables de las moléculas del anticuerpo. Una “composición de anticuerpos policlonales recombinantes anti-HER3” es una composición que comprende una mezcla de dos o más anticuerpos monoclonales recombinantes que se unen a HER3.

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

Una composición de anticuerpos recombinantes que comprende “al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3” comprenderá al menos dos de los anticuerpos específicos, pero puede incluir más de dos de los anticuerpos anti-HER3 descritos aquí. En ciertos casos, tal composición de anticuerpos recombinantes puede incluir un número relativamente grande de anticuerpos anti-HER3 individuales, por ejemplo hasta 10 o más, tal como hasta 15 o 20, pero normalmente incluirá menos de 10 anticuerpos anti-HER3 diferentes, es decir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 anticuerpos. Las composiciones de anticuerpos recombinantes de la invención incluirán más típicamente no más de alrededor de 6 anticuerpos anti-HER3 diferentes, y en muchos casos incluirán no más de 4 anticuerpos anti-HER3 diferentes. En realizaciones preferidas, una composición de anticuerpos recombinantes de la invención incluirá por lo tanto 2, 3 o 4 anticuerpos anti-HER3 diferentes, típicamente 2 o 3 anticuerpos anti-HER3 diferentes.

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

El término “epítipo” se usa para describir una parte de una molécula más grande (por ejemplo, antígeno o sitio antigénico) que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es una porción de una molécula más grande que provoca una respuesta de anticuerpo en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es una porción de una molécula más grande a la que se une inmunoespecíficamente un anticuerpo según se determina mediante cualquier método conocido en la técnica. Los epítopos antigénicos no son necesariamente inmunogénicos. Un antígeno es una sustancia a la que se une inmunoespecíficamente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, por ejemplo una toxina, virus, bacteria, proteína o ADN. A menudo, un antígeno o sitio antigénico tiene más de un epítipo, excepto que sea muy pequeño, y a menudo es capaz de estimular una respuesta inmune. Los epítopos pueden ser lineales o conformacionales. Un epítipo lineal consiste generalmente en alrededor de 6 a 10 aminoácidos adyacentes en una molécula proteica que son reconocidos por un anticuerpo. Por el contrario, un epítipo conformacional consiste en aminoácidos que no están dispuestos secuencialmente, pero en el que un anticuerpo reconoce una estructura tridimensional particular. Cuando una molécula proteica se pliega en una estructura tridimensional, los aminoácidos que forman el epítipo se yuxtaponen, permitiendo al anticuerpo reconocer el epítipo conformacional. En una proteína desnaturalizada, solamente se reconocen los epítopos lineales. Por definición, un epítipo conformacional, debe estar fuera de la proteína plegada.

La expresión “epítopos distintos” se refiere al hecho de que cuando dos anticuerpos diferentes de la invención se unen a epítopos distintos, hay menos de 100% de competición por la unión al antígeno, preferiblemente menos de 80% de competición por la unión al antígeno, más preferiblemente menos de 50% de competición por la unión al antígeno, y lo más preferible tan poca competición como sea posible, tal como menos de alrededor de 25% de competición por la unión al antígeno. Los anticuerpos capaces de competir entre sí por la unión al mismo antígeno se pueden unir a los mismos epítopos o epítopos que solapan, o pueden tener un sitio de unión en la vecindad próxima entre sí, de manera que la competición está provocada principalmente por impedimento estérico. Un análisis para “epítopos distintos” de pares de anticuerpos se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo por medio de experimentos de unión en condiciones de anticuerpos saturantes usando FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) u otro análisis de citometría de flujo sobre células que expresan HER3 y anticuerpos marcados fluorescentemente individuales, o mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) usando el antígeno de HER3 capturado o conjugado a una superficie de la célula que fluye. En el Ejemplo 12 más abajo se describe un método para determinar la competición entre anticuerpos usando SPR.

Los epítomos distintos preferiblemente “no solapan”, en el sentido de que dos anticuerpos anti-HER3 diferentes en una composición de la invención tienen una competición suficientemente baja por la unión al antígeno de manera que los dos anticuerpos son capaces de unirse simultáneamente a sus epítomos respectivos. Se entenderá por personas expertas en la técnica que puede haber grados diferentes de solapamiento, y que epítomos distintos pueden ser considerados como “no solapantes” a pesar de la presencia de cierto grado de solapamiento, en tanto que los anticuerpos respectivos sean capaces de unirse sustancialmente a sus epítomos. Esto se considera generalmente que es el caso cuando la competición por la unión al antígeno entre los dos anticuerpos es menor que alrededor de 50%.

De forma similar, un anticuerpo que “compite por la unión” con un anticuerpo anti-HER3 de la invención se puede definir como aquél que exhibe competición por la unión al antígeno de alrededor de 50% o más.

Los anticuerpos que se unen a diferentes epítomos en el mismo antígeno pueden tener efectos variables sobre la actividad del antígeno al que se unen, dependiendo de la localización del epítomo. Un anticuerpo que se une a un epítomo en un sitio activo del antígeno puede bloquear completamente la función del antígeno, mientras que otro anticuerpo que se une en un epítomo diferente puede no tener efecto o tener un efecto pequeño sobre la actividad del antígeno solo. Sin embargo, tales anticuerpos pueden todavía activar el complemento y de ese modo dar como resultado la eliminación del antígeno, y pueden dar como resultado efectos sinérgicos cuando se combinan con uno o más anticuerpos que se unen a diferentes epítomos en el mismo antígeno. En el contexto de la presente invención, el epítomo es preferiblemente una porción del dominio extracelular de HER3. Los antígenos de la presente invención son preferiblemente proteínas, polipéptidos o sus fragmentos de HER3 de dominio extracelular, a los que se une inmunoespecíficamente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Un antígeno asociado a HER3 también puede ser un análogo o derivado del dominio extracelular del polipéptido o su fragmento de HER3, al que se une inmunoespecíficamente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

El término “inmunoglobulina” se usa normalmente como una designación colectiva de la mezcla de anticuerpos encontrada en sangre o suero, pero también se puede usar para designar una mezcla de anticuerpos derivada de otras fuentes.

La expresión “par codificante de V_H y V_L cognado” describe un par original de secuencias codificantes de V_H y V_L contenidas en o derivadas de la misma célula productora de anticuerpos. De este modo, un par cognado de V_H y V_L representa el emparejamiento de V_H y V_L originalmente presente en el donante del que deriva tal célula. La expresión “un anticuerpo expresado a partir de un par codificante de V_H y V_L” indica que un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo se produce a partir de un vector, plásmido u otro polinucleótido que contiene la secuencia codificante de V_H y V_L. Cuando un par codificante de V_H y V_L cognado se expresa, ya sea como un anticuerpo completo o como un fragmento estable del mismo, conservan la afinidad y especificidad de unión del anticuerpo expresado originalmente a partir de la célula de la que derivan. Una biblioteca de pares cognados también se denomina un repertorio o colección de pares cognados, y se puede mantener individualmente o reunido.

Por “proteína” o “polipéptido” se quiere decir cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación post-traducciona. Las proteínas pueden existir como monómeros o multímeros, que comprenden dos o más cadenas polipeptídicas ensambladas, fragmentos de proteínas, polipéptidos, oligopéptidos, o péptidos.

La expresión “promotores de cabeza a cabeza” (también conocidos como “promotores bidireccionales”) se refiere a un par de promotores que se colocan de forma muy próxima de manera que la transcripción de dos fragmentos génicos conducida por los promotores se produce en direcciones opuestas.

“Transfección” se usa aquí como un término amplio para introducir ADN extraño en una célula. El término también pretende cubrir otros métodos equivalentes funcionales para introducir ADN extraño en una célula, tales como, por ejemplo, transformación, infección, transducción o fusión de una célula donante y una célula aceptora.

El término “HER3” (también conocido como ErbB-3) representa el “receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano”, como se describe en la sección “Antecedentes de la invención”. Como se usa aquí, pretende incluir variantes, isoformas y homólogos de especies de HER3. Preferiblemente, la unión de un anticuerpo de la invención a HER3 inhibe el crecimiento de células que expresan HER3 (es decir, típicamente células tumorales) al inhibir la formación de complejos heteroméricos entre HER3 y otros miembros de la familia de ErbB, por ejemplo heterodimerización con HER2.

Como se usa aquí, la expresión “inhibe el crecimiento” (por ejemplo, referido a las células) está destinada a incluir cualquier disminución medible en la proliferación (incremento en el número de células) o metabolismo de una célula cuando se pone en contacto con un anticuerpo anti-HER3, en comparación con el crecimiento de las mismas células en ausencia de un anticuerpo anti-HER3, por ejemplo inhibición del crecimiento de un cultivo celular en al menos alrededor de 10%, y preferiblemente más, tal como al menos alrededor de 20% o 30%, más preferiblemente al menos alrededor de 40% o 50%, tal como al menos alrededor de 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, o incluso 100%. La inhibición del crecimiento se puede determinar, por ejemplo, en estirpes de células cancerosas relevantes, como se describe en los ejemplos más abajo.

Como se usan aquí, las expresiones “inhibe la dimerización” o “inhibe la formación de dímeros” se refieren a cualquier reducción medible en la capacidad de HER3 para formar dímeros con otros receptores, en particular HER2, pero también EGFR o HER4, como resultado de la unión de un anticuerpo anti-HER3, en comparación con la formación de dímeros en ausencia de un anticuerpo anti-HER3.

5 El término “tratamiento”, como se usa aquí, se refiere a la administración de un anticuerpo o composición de anticuerpos anti-HER3 de la invención en una cantidad suficiente para suavizar, reducir, mejorar o erradicar (curar) síntomas o estados mórbidos. La administración de dos o más anticuerpos anti-HER3 de la invención será generalmente por medio de la administración simultánea de los anticuerpos, preferiblemente en forma de una composición que contiene todos los anticuerpos anti-HER3 a usar para el tratamiento. Sin embargo, también es
10 posible administrar dos o más anticuerpos anti-HER3 de la invención de forma separada. Las referencias aquí a, por ejemplo, la administración de una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos dos anticuerpos anti-HER3 se debería entender por lo tanto que engloba no solo la administración de una composición que comprende los al menos dos anticuerpos como tales, sino también la administración separada de los anticuerpos. De este modo, se pueden administrar simultánea, secuencial o separadamente combinaciones de dos o
15 más anticuerpos anti-HER3 de la invención.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias, por ejemplo, secuencias de la región variable, se refiere al número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (calculado como nº de posiciones idénticas/nº total de posiciones x 100), teniendo en cuenta espacios que se deben introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se
20 puede lograr usando software fácilmente disponible. Existen programas de software adecuados de distintas fuentes, tanto para uso en línea como para descargarlos, y para el alineamiento tanto de secuencias proteicas como nucleotídicas. Un programa adecuado es ClustalW (Thompson et al. (1994) Nucleic Acids Res. 11; 22(22):4673-80), disponible de www.clustal.org, o como alternativa, por ejemplo, del European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk), que también proporciona otras diversas herramientas informáticas proteicas y nucleotídicas.

25 Realizaciones particulares

Un aspecto de la invención se refiere a diversos nuevos anticuerpos anti-HER3.

También se describe aquí un anticuerpo recombinante anti-HER3 que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada de uno cualquiera de los anticuerpos citados aquí como anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259.

30 Se describe aquí un anticuerpo recombinante anti-HER3 que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada y la secuencia CDR3 de cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259..

Se describe aquí un anticuerpo recombinante anti-HER3 que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos
35 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259.

Se describe aquí un anticuerpo recombinante anti-HER3 que comprende la secuencia de la región variable de cadena pesada y la secuencia de la región variable de cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259, o que comprende una variante humanizada y/o con madurez de la afinidad de dicha secuencia de la región variable de cadena pesada y/o de cadena ligera, o que
40 comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada y una secuencia de la región variable de cadena ligera que tiene cada una al menos 90%, o al menos 95%, de identidad de secuencia con dichas secuencias de la región variable de cadena pesada y de la región variable de cadena ligera, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con dichas secuencias, y que compiten por la unión con dicho anticuerpo.

45 Se describe aquí un anticuerpo recombinante anti-HER3 que se une al mismo epítipo que y que compite por la unión con cualquiera de los anticuerpos definidos anteriormente, así como composiciones de anticuerpos que comprenden uno o más de tales anticuerpos, preferiblemente que comprenden al menos dos de tales anticuerpos, por ejemplo dos o tres de tales anticuerpos como se describe en cualquier otra parte aquí.

50 La Tabla 1 a continuación muestra los números de ID de secuencia, como se expone en el listado de secuencias anejo, para las secuencias de ADN y de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (VH) y de las cadenas ligeras (LC) de los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259, (en los que, como se explica anteriormente, la secuencia de cadena ligera incluye tanto la secuencia de la región variable de cadena ligera (VL) como la secuencia de la región constante kappa humana).

Tabla 1: Números de ID de secuencia para las secuencias de ADN y de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y las cadenas ligeras de anticuerpos anti-HER3 seleccionados

Nº de anticuerpo	Sec. de ADN de VH	Sec. de proteína de VH	Sec. de ADN de LC	Sec. de proteína de LC
4785	1	2	3	4
4889	5	6	7	8
4935	9	10	11	12
5038	13	14	15	16
5082	17	18	19	20
5101	21	22	23	24
5106	25	26	27	28
5143	29	30	31	32
5144	33	34	35	36
5259	37	38	39	40

5 Se describe aquí una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3, en la que los anticuerpos primero y segundo se unen a distintos epítomos de HER3, y en la que al menos uno de los anticuerpos primero y segundo se selecciona del grupo de anticuerpos explicados anteriormente, por ejemplo en la que ambos o todos los anticuerpos anti-HER3 en la composición se seleccionan del grupo de anticuerpos explicados anteriormente.

10 Se describe aquí una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3, en la que los anticuerpos primero y segundo se unen a distintos epítomos de HER3, y en la que cada uno de los anticuerpos primero y segundo comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259.

15 Se describe aquí una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3, en la que los anticuerpos primero y segundo se unen a distintos epítomos de HER3, y en la que cada uno de los anticuerpos primero y segundo comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259.

20 Se describe aquí una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3, en la que los anticuerpos primero y segundo se unen a distintos epítomos de HER3, y en la que cada uno de los anticuerpos primero y segundo comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259.

25 También se describe una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3, en la que los anticuerpos primero y segundo se unen a distintos epítomos de HER3, y en la que cada uno de los anticuerpos primero y segundo comprende la secuencia de la región variable de cadena pesada o una variante humanizada y/o con maduración de la afinidad de la misma, y la secuencia de la región variable de cadena ligera o una variante humanizada y/o con maduración de la afinidad de la misma, de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259; o en la que cada uno de los anticuerpos primero y segundo comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada y una secuencia de la región variable de cadena ligera, que tienen cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia, con las secuencias de la región variable de cadena pesada y de la región variable de cadena ligera, respectivamente, de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259, y en la que los anticuerpos primero y segundo compiten por la unión con los anticuerpos respectivos a partir de los que derivan.

35 También se describe aquí una composición de anticuerpos que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3 que se unen a distintos epítomos de HER3; en la que

5 a) el primer anticuerpo recombinante comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada y una secuencia de la región variable de cadena ligera que tienen al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia, con las secuencias de la región variable de cadena pesada y de la región variable de cadena ligera, respectivamente, de un anticuerpo de referencia cualquiera seleccionado de los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259, y en la que el primer anticuerpo recombinante se une al mismo epítipo que y compite por la unión con dicho anticuerpo de referencia; y

10 b) el segundo anticuerpo recombinante comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada y una secuencia de la región variable de cadena ligera que tienen al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia, con las secuencias de la región variable de cadena pesada y de la región variable de cadena ligera, respectivamente, de un anticuerpo de referencia cualquiera seleccionado de los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259, en la que dicho anticuerpo de referencia es diferente del anticuerpo de referencia de a), y en la que el segundo anticuerpo recombinante se une al mismo epítipo que y compite por la unión con dicho anticuerpo de referencia.

20 Una realización aún adicional de este aspecto de la invención es una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primero y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3, en la que los anticuerpos primero y segundo se unen a distintos epítipos de HER3, y en la que los anticuerpos primero y segundo son los anticuerpos 5038 y 5082, o sus variantes humanizadas, como se define en las reivindicaciones. También se describe aquí una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primero y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3, en la que los anticuerpos primero y segundo se unen a distintos epítipos de HER3, y en la que los anticuerpos primero y segundo se seleccionan del grupo que consiste en los anticuerpos que se unen al mismo epítipo que y compiten por la unión con los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259.

25 Se describe aquí una composición de anticuerpos que comprende al menos un primero y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3, que se unen a distintos epítipos de HER3, en la que al menos uno de dichos anticuerpos se selecciona del grupo que consiste en:

30 (a) un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada y la secuencia de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 4785;

(b) un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada y la secuencia de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 4889;

35 (c) un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada y la secuencia de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 4935;

(d) un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada y la secuencia de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 5038;

(e) un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada y la secuencia de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 5082;

40 (f) un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada y la secuencia de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 5101;

(g) un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada y la secuencia de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 5106;

45 (h) un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada y la secuencia de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 5143;

(i) un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada y la secuencia de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 5144; y

(j) un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada y la secuencia de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 5259.

50 Preferiblemente, tanto dicho primer como dicho segundo anticuerpo recombinante anti-HER3 se seleccionan de los anticuerpos (a)-(j) expuestos anteriormente. La composición también puede comprender al menos un tercer anticuerpo recombinante anti-HER3, preferiblemente un anticuerpo seleccionado de los anticuerpos (a)-(j) anteriores. La composición de anticuerpos puede comprender al menos un primero y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3 que se unen a distintos epítipos de HER3, en la que cada uno de dichos anticuerpos

primero y segundo se unen al mismo epítopo que y compiten por la unión con uno de los anticuerpos (a)-(j) expuestos anteriormente.

También se describe una composición de anticuerpos que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3 que se unen a distintos epítopos de HER3, en la que al menos unos de dichos anticuerpos se selecciona del grupo que consiste en:

- 5
- (A) un anticuerpo que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 4785;
 - (B) un anticuerpo que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 4889;
 - 10 (C) un anticuerpo que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 4935;
 - (i) un anticuerpo que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 5038; y
 - (ii) un anticuerpo que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 5082.
 - (F) un anticuerpo que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 5101;
 - (G) un anticuerpo que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 5106;
 - 20 (H) un anticuerpo que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 5143;
 - (I) un anticuerpo que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 5144; y
 - 25 (J) un anticuerpo que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 5259.

Tanto dicho primer como dicho segundo anticuerpo recombinante anti-HER3 se pueden seleccionar de los anticuerpos (A)-(J) expuestos anteriormente. La composición también puede comprender al menos un tercer anticuerpo recombinante anti-HER3, preferiblemente un anticuerpo seleccionado de los anticuerpos (A)-(J) anteriores. La composición de anticuerpos puede comprender al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3 que se unen a distintos epítopos de HER3, en la que cada uno de dichos anticuerpos primero y segundo se une al mismo epítopo que y compite por la unión con uno de los anticuerpos (A)-(J) expuestos anteriormente.

Se describe aquí una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3, en la que los anticuerpos primero y segundos compiten por la unión con los anticuerpos 5082 y 5106, respectivamente, y son:

- anticuerpos 5082 y 5106, o variantes humanizadas y/o con maduración de la afinidad de los mismos;
- un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 5106;
- 40 • un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5106;
- un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5106;
- 45 • un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5106; o
- un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, teniendo cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y
- 50

ligera que tienen cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 5106.

5 Se describe aquí una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante, en la que los anticuerpos primero y segundos compiten por la unión con los anticuerpos 5082 y 4785, respectivamente, y son:

- anticuerpos 5082 y 4785, o variantes humanizadas y/o con maduración de la afinidad de los mismos;
- un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 4785;
- 10 • un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4785;
- un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4785;
- 15 • un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4785; o

20 • un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, teniendo cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera que tienen cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 4785.

25 Se describe aquí una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante, en la que los anticuerpos primero y segundos compiten por la unión con los anticuerpos 5082 y 5038, respectivamente, y son:

- anticuerpos 5082 y 5038, o variantes humanizadas y/o con maduración de la afinidad de los mismos;
- un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 5038;
- 30 • un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5038;
- un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5038;
- 35 • un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5038; o

40 • un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, teniendo cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera que tienen cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 5038.

45 Se describe aquí una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante, en la que los anticuerpos primero y segundos compiten por la unión con los anticuerpos 5082 y 5144, respectivamente, y son:

- anticuerpos 5082 y 5144, o variantes humanizadas y/o con maduración de la afinidad de los mismos;
- 50 • un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 5144;

ES 2 692 379 T3

- un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5144;
- 5 • un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5144;
- un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5144; o
- 10 • un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, teniendo cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 5082, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera que tienen cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y
- 15 ligera, respectivamente, del anticuerpo 5144.

Se describe aquí una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante, en la que los anticuerpos primero y segundos compiten por la unión con los anticuerpos 4889 y 5143, respectivamente, y son:

- anticuerpos 4889 y 5143, o variantes humanizadas y/o con maduración de la afinidad de los mismos;
- 20 • un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 4889, y un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 5143;
- un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4889, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5143;
- 25 • un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4889, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5143;
- un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4889, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5143; o
- 30 • un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, teniendo cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 4889, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera que tienen cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y
- 35 ligera, respectivamente, del anticuerpo 5143.

Se describe aquí una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante, en la que los anticuerpos primero y segundos compiten por la unión con los anticuerpos 4785 y 5038, respectivamente, y son:

- 40 • anticuerpos 4785 y 5038, o variantes humanizadas y/o con maduración de la afinidad de los mismos;
- un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 4785, y un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 5038;
- un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4785, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5038;
- 45 • un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4785, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5038;
- un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4785, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5038; o
- 50 • un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, teniendo cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de

identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 4785, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera que tienen cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 5038.

5 Se describe aquí una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante, en la que los anticuerpos primero y segundos compiten por la unión con los anticuerpos 4785 y 5259, respectivamente, y son:

- anticuerpos 4785 y 5259, o variantes humanizadas y/o con maduración de la afinidad de los mismos;
- 10 • un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 4785, y un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 5259;
- un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4785, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5259;
- 15 • un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4785, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5259;
- un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4785, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5259; o
- 20 • un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, teniendo cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 4785, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera que tienen cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 5259.
- 25

Se describe aquí una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante, en la que los anticuerpos primero y segundos compiten por la unión con los anticuerpos 5106 y 4889, respectivamente, y son:

- 30 • anticuerpos 5106 y 4889, o variantes humanizadas y/o con maduración de la afinidad de los mismos;
- un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 5106, y un anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 4889;
- un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5106, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4889;
- 35 • un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5106, y un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4889;
- un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5106, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 4889; o
- 40 • un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, teniendo cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 5106, y un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera que tienen cada una al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo 4889.
- 45

Las tablas 2 y 3 a continuación muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada (Tabla 2) y de la cadena ligera (Tabla 3) de diversos anticuerpos anti-HER3. Las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y de la cadena ligera, incluyendo la región variable de cadena ligera, de estos anticuerpos, así como las secuencias codificantes de ADN (optimizadas para la expresión en células CHO) se proporcionan en el listado de secuencias anexo. Véase la Tabla 1 anterior para un resumen de los números de SEQ ID para estas secuencias.

Tabla 2: Secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de anticuerpos anti-HER3 seleccionados

Número de anticuerpo	CDR1 de H	CDR2 de H	CDR3 de H	SEQ ID NOs (CDR1/2/3)
4785	GYSFTSYY	IYPGSGHT	CARPPYYSNYADVW	45-47
4889	GYSITSAYY	VSVDGSN	CAREGDYGYSDYW	48-50
4935	GYTFTSYY	IYPGNVHT	CVRRYGYDGDWFAYW	51-53
5038	GYSITSGFY	ISVDGSN	CARGGGYYGNLFDYW	54-56
5082	GYSITSAYY	IGYDGRN	CSREGDYGYSDYW	48, 57-58
5101	GFTFSSYG	IRDGGGYT	CARGILDYW	59-61
5106	GFTFSSFA	ISDGGSHL	CARGILDYW	62-63, 61
5143	GYSFTSYY	IYPGSGHT	CARPPYYS NYADVW	45-47
5144	GFSLSRYS	IWGGGST	CVRKGITTTGFDYW	64-66
5259	GFSLSRYT	IWGGGST	CARKGITTTGFDYW	67, 65, 68

Tabla 3: Secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de anticuerpos anti-HER3 seleccionados

Número de anticuerpo	CDR1 de L	CDR2 de L	CDR3 de L	SEQ ID NOs (CDR1/3)
4785	QSLNLSGNQKNY	WAS	CQSDYSYPYTF	69, 70
4889	QDISNY	YTS	CQQSNTLPWTF	71, 72
4935	ESVDSYGNTF	RAS	CQQSNEDPWTF	73, 74
5038	QDISNY	HTS	CQQGITLPWTF	71, 75
5082	QDINNY	YTS	CQQSETLPWTF	76, 77
5101	QDISNY	YTS	CQQGNTLPYTF	71, 78
5106	QDINNY	YTS	CQQYSRIPYTF	76, 79
5143	QSLNLSGNQKNY	WAS	CQNDYSYPYTF	69, 80
5144	SSVSY	DTS	CQQLSSYPPTF	81, 82
5259	SSVSY	DTS	CQQLNSYPPTF	81, 83

- 5 También se describen moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo, es decir, un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259, o una variante humanizada y/o con madurez de la afinidad de los mismos; o que codifica una secuencia de la región variable de cadena pesada y/o ligera de tal anticuerpo, o una secuencia de cadena pesada y/o ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia, con tal secuencia de la región variable de cadena pesada y/o ligera.
- 10 La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 o 39, o secuencias que codifican la misma secuencia de aminoácidos que una cualquiera de dichas secuencias nucleotídicas.
- 15 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico como se define anteriormente. Como se señala anteriormente, los vectores de expresión para uso en el contexto de la presente invención pueden ser de cualquier tipo adecuado conocido en la técnica, por ejemplo un vector plasmídico o vírico.

Todavía un aspecto adicional de la invención se refiere a una célula hospedante que comprende una molécula de ácido nucleico como se define anteriormente, en la que dicha célula hospedante es capaz de expresar un anticuerpo anti-HER3 codificado por dicha molécula de ácido nucleico.

5 En un aspecto adicional, las especificidades de unión de dos cualesquiera anticuerpos individuales descritos aquí se pueden combinar en una molécula de unión biespecífica. Tal molécula de unión biespecífica comprende preferiblemente las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera de los dos anticuerpos seleccionados. La molécula de unión biespecífica puede ser un anticuerpo de dominio variable dual, es decir, en el que los dos brazos del anticuerpo comprenden dos dominios variables diferentes, o puede estar en forma de un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab biespecífico o un scFv biespecífico.

10 Producción de anticuerpos anti-HER3 y composiciones de anticuerpos

También se describen métodos para producir un anticuerpo anti-HER3 o una mezcla de anticuerpos anti-HER3 de la invención. También se describe un método para producir un anticuerpo anti-HER3 como se define aquí, que comprende proporcionar una célula hospedante como se define anteriormente capaz de expresar un anticuerpo anti-HER3, cultivar dicha célula hospedante en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y aislar el anticuerpo resultante.

15 En una realización, la invención se refiere a un método para producir una mezcla de anticuerpos recombinantes anti-HER3 de la invención, que comprende al menos un primer y un segundo anticuerpo recombinante anti-HER3 como se describen aquí, comprendiendo el método proporcionar al menos una primera célula hospedante y una segunda célula hospedante, en el que las células hospedantes primera y segunda son capaces cada una de expresar un anticuerpo recombinante anti-HER3, cultivar las células hospedantes primera y segunda en condiciones adecuadas para la expresión de los anticuerpos primero y segundo, y aislar los anticuerpos primero y segundo resultantes.

20 Un anticuerpo o una composición de anticuerpos de la presente invención se puede producir mediante métodos generalmente conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos recombinantes monoclonales o policlonales.

25 De este modo, en el caso de producir un único anticuerpo de la invención, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para producir anticuerpos monoclonales recombinantes. Para la producción de una composición de anticuerpos que comprende dos o más anticuerpos anti-HER3 de la invención, los anticuerpos individuales se pueden producir de forma separada, es decir, produciéndose cada anticuerpo en un biorreactor separado, o los anticuerpos individuales se pueden producir juntos en un único biorreactor. Cuando el número de anticuerpos diferentes en una composición es mayor que, por ejemplo, dos o tres, generalmente será preferiblemente por razones de eficacia de coste producir los anticuerpos juntos en un único biorreactor. Por otro lado, cuando la composición contiene solamente un número pequeño de diferentes anticuerpos, por ejemplo dos, tres o posiblemente cuatro anticuerpos diferentes, la decisión de producirlos separadamente en diferentes biorreactores, o juntos en un único biorreactor, se tendrá que tomar basándose en circunstancias individuales. Si la composición de anticuerpos se produce en más de un biorreactor, la composición de anticuerpos anti-HER3 purificada se puede obtener reuniendo los anticuerpos obtenidos a partir de sobrenadantes purificados individualmente procedentes de cada biorreactor. En el documento WO 2009/129814 se describen diversos enfoques para producir una composición de anticuerpos policlonales en múltiples biorreactores, en los que las estirpes celulares o preparaciones de anticuerpos se combinan en un punto posterior aguas arriba o antes de o durante el procesamiento aguas abajo.

40 En el caso de producir dos o más anticuerpos individuales en un único biorreactor, esto se puede llevar a cabo, por ejemplo como se describe en los documentos WO 2004/061104 o WO 2008/145133. El método descrito en el documento WO 2004/061104 se basa en la integración específica del sitio de la secuencia codificante del anticuerpo en el genoma de las células hospedantes individuales, asegurándose de que las cadenas proteicas de V_H y V_L se mantienen en su emparejamiento original durante la producción. Además, la integración específica del sitio minimiza efectos de posición, y por lo tanto se espera que el crecimiento y propiedades de expresión de las células individuales en la estirpe celular policlonal sean muy similares. En general, el método implica lo siguiente: I) una célula hospedante con uno o más sitios de reconocimiento de recombinasa; II) un vector de expresión con al menos un sitio de reconocimiento de recombinasa compatible con el de la célula hospedante; III) la generación de una colección de vectores de expresión transfiriendo los pares codificantes de V_H y V_L seleccionados desde el vector de cribado hacia un vector de expresión de manera que un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo se pueda expresar a partir del vector (tal transferencia puede no ser necesaria si el vector de cribado es idéntico al vector de expresión); IV) la transfección de la célula hospedante con la colección de vectores de expresión y un vector que codifica una recombinasa capaz de combinar los sitios de reconocimiento de recombinasa en el genoma de la célula hospedante con aquel en el vector; V) obtener/generar una estirpe celular policlonal a partir de la célula hospedante transfectada, y VI) expresar y recoger la composición de anticuerpos a partir de la estirpe celular policlonal.

El documento WO 2008/145133 describe un enfoque alternativo para la producción de dos o más anticuerpos diferentes en un único biorreactor. Este método implica la generación de una estirpe celular policlonal capaz de expresar un anticuerpo policlonal u otra proteína policlonal que comprende dos o más miembros distintos a)

proporcionando un conjunto de vectores de expresión, en el que cada uno de dichos vectores comprende al menos una copia de un ácido nucleico distinto que codifica un miembro distinto de la proteína policlonal, transfectando de forma separada células hospedantes con cada uno de los vectores de expresión en condiciones que eviten la integración específica del sitio de los vectores de expresión en el genoma de las células, obteniendo de ese modo dos o más composiciones de células, expresando cada composición un miembro distinto de la proteína policlonal, y c) mezclando las al menos dos composiciones de células para obtener una estirpe celular policlonal. Los métodos de los documentos WO 2004/061104 y WO 2008/145133 tienen ambos la ventaja de permitir que todos los miembros que constituyen el anticuerpo policlonal recombinante se produzcan en un único biorreactor y se purifiquen en un único proceso, evitando de ese modo la necesidad de procesos de producción y purificación distintos para cada anticuerpo, mientras que al mismo tiempo da como resultado una producción sorprendentemente uniforme de los diferentes anticuerpos. El método del documento WO 2008/145133 tiene la ventaja adicional de proporcionar un mayor rendimiento, puesto que cada célula de producción puede portar múltiples copias del polinucleótido que codifica un anticuerpo particular.

Los anticuerpos de la invención se pueden producir en diversos tipos de células, incluyendo células de mamíferos así como células eucariotas o procariontas no de mamíferos, tales como células vegetales, células de insectos, células de levaduras, hongos, *E. coli*, etc. Sin embargo, los anticuerpos se producen preferiblemente en células de mamíferos, por ejemplo células CHO, células COS, células BHK, células de mieloma (por ejemplo células Sp2/0 o NSO), fibroblastos tales como NIH 3T3, o células humanas inmortalizadas tales como células HeLa, células HEK 293 o células PER.C6.

Los métodos para transfectar una secuencia de ácido nucleico en una célula hospedante son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición, 2001). Para la integración específica del sitio, por ejemplo como se describe en el documento WO 2004/061104, una célula hospedante adecuada comprenderá uno o más sitios de reconocimiento de recombinasa en su genoma. En este caso, un vector de expresión adecuado comprende un sitio de reconocimiento de recombinación que coincide con el sitio o sitios de reconocimiento de recombinasa de la célula hospedante. En el documento WO 2004/061104 se pueden encontrar más detalles con respecto a, por ejemplo, la transferencia de pares codificantes de VH y VL seleccionados a partir de un vector de cribado usando el enfoque de integración específica del sitio.

Cuando una composición de anticuerpos de la invención que comprende dos o más anticuerpos anti-HER3 se va a producir en un único biorreactor, se pueden seleccionar estirpes celulares con velocidades de proliferación similares, y preferiblemente niveles de expresión de anticuerpos similares, para generar una estirpe celular policlonal. La estirpe celular policlonal se genera entonces mezclando las estirpes celulares individuales en una relación predefinida. Véanse los documentos WO 2009/129814, WO 2004/061104 y WO 2008/145133 para mayor información y ejemplos relacionados con la generación de estirpes celulares policlonales que expresan anticuerpos policlonales, así como la producción de anticuerpos policlonales usando tales estirpes celulares.

Una realización de la presente invención es así una estirpe celular policlonal capaz de expresar dos o más anticuerpos anti-HER3 de la presente invención. Una realización adicional es una estirpe celular policlonal en la que cada célula individual es capaz de expresar un único par de VH y VL, y la estirpe celular policlonal como un todo es capaz de expresar una colección de pares de VH y VL, en la que cada par de VH y VL codifica un anticuerpo anti-HER3.

Una composición de anticuerpos recombinantes de la presente invención se puede fabricar en un único biorreactor cultivando una ampolla procedente de un banco de células de trabajo policlonales (pWCB) en un medio apropiado durante un período de tiempo para permitir un nivel suficiente de expresión de los anticuerpos a la vez que mantiene una uniformidad sustancial en los niveles de expresión relativos de los anticuerpos individuales expresados por la estirpe celular policlonal. Normalmente será adecuado un tiempo de producción de entre aproximadamente 15 y 50 días. Se pueden usar métodos de cultivo conocidos en la técnica, tales como cultivo por lote alimentado o cultivo por perfusión. El medio de cultivo es preferiblemente un medio libre de suero, más preferiblemente un medio libre de suero y libre de proteínas, por ejemplo un medio químicamente definido. Tales medios de cultivo se diseñan típicamente para el crecimiento del tipo celular particular que se use para la producción, y hay comercialmente disponibles numerosas formulaciones de medios adecuadas.

La composición de anticuerpos recombinantes se obtiene a partir del medio de cultivo y se purifica mediante técnicas de purificación convencionales. Estas pueden incluir, por ejemplo, cromatografía de afinidad combinada con etapas subsiguientes de purificación tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y filtración en gel, puesto que estas técnicas de purificación se han usado frecuentemente para la purificación de anticuerpos recombinantes. Cuando dos o más anticuerpos son producidos por una estirpe celular policlonal en un único biorreactor, la presencia de todos los miembros individuales en la composición de anticuerpos policlonales se evalúa típicamente tras la purificación, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio iónico. La caracterización de una composición de anticuerpos policlonales se puede realizar, por ejemplo, como se describe en los documentos WO 2006/007853, WO 2009/065414, WO 2011/042024 y WO 2011/042027.

Composiciones Terapéuticas

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo al menos dos anticuerpos anti-HER3 de la invención, o una composición de Fab recombinante anti-HER3 u otra composición de fragmentos de anticuerpos recombinantes anti-HER3. Preferiblemente, el ingrediente activo de tal composición farmacéutica es una composición de anticuerpos recombinantes anti-HER3 como se describe anteriormente, que comprende dos o más anticuerpos anti-HER3. Tales composiciones están destinadas a mejorar, prevenir y/o tratar el cáncer. La composición farmacéutica se puede administrar a un ser humano o a un animal doméstico o mascota, pero típicamente se administrará a seres humanos.

La relación entre los anticuerpos individuales en la composición terapéutica de la invención, o, en el caso de anticuerpos individuales de la invención que se administren simultánea, secuencial o separadamente, la relación entre los anticuerpos a administrar, a menudo será tal que los anticuerpos se administren en cantidades iguales, pero éste no necesariamente tiene que ser el caso. De este modo, una composición de la invención que comprende dos anticuerpos anti-HER3 a menudo los contendrá en una relación 1:1, y una composición que comprende tres anticuerpos anti-HER3 a menudo los contendrá en una relación 1:1:1. Dependiendo de las características de los anticuerpos individuales, sin embargo, puede ser deseable usar cantidades no iguales de los diferentes anticuerpos. Las relaciones adecuadas para los diferentes anticuerpos anti-HER3 en las composiciones de la invención se pueden determinar como se describe en el documento WO 2010/040356, que describe métodos para identificar y seleccionar la relación estequiométrica óptima entre entidades químicas en un producto farmacéutico combinatorio, por ejemplo una composición de anticuerpos policlonales, para obtener un fármaco combinatorio con potencia y eficacia óptimas.

Además de al menos un anticuerpo de la invención, o fragmento del mismo, la composición farmacéutica comprenderá adicionalmente al menos un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Éstos pueden incluir, por ejemplo, conservantes, estabilizantes, tensioactivos/agentes humectantes, agentes emulsionantes, solubilizantes, sales para regular la presión osmótica, y/o amortiguadores. Las disoluciones o suspensiones pueden comprender además sustancias que incrementan la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinilpirrolidona, o gelatina. Un valor de pH adecuado para la composición farmacéutica estará generalmente en el intervalo de alrededor de 5,5 a 8,5, tal como alrededor de 6 a 8, por ejemplo alrededor de 7, mantenido, cuando sea apropiado, mediante el uso de un amortiguador.

Se puede emplear la práctica farmacéutica convencional para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar, por ejemplo, a pacientes con cáncer. La administración será típicamente terapéutica, queriendo decir que se administra después de que se ha diagnosticado una patología cancerosa. Se puede emplear cualquier vía apropiada de administración, por ejemplo la administración parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, en aerosol, en supositorio u oral. Las composiciones farmacéuticas de la invención se administrarán típicamente en forma de disoluciones o suspensiones líquidas, más típicamente disoluciones o suspensiones acuosas, en particular disoluciones o suspensiones acuosas isotónicas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se preparan de manera conocida *per se*, por ejemplo por medio de procedimientos de disolución, liofilización, mezclamiento, granulación o confección convencionales. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular según la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21ª edición), ed. A.R. Gennaro, 2005, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA; y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, ed. J. Swarbrick, 3ª edición, 2006, Informa Healthcare, New York, NY, USA).

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

Las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 1% a aproximadamente 95%, preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 90%, de ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden producir, por ejemplo, en forma de dosis unitaria, tal como en forma de ampollas, viales, supositorios, comprimidos, o cápsulas. Las formulaciones se pueden administrar a individuos humanos en cantidades terapéutica o profilácticamente eficaces (por ejemplo, cantidades que previenen, eliminan, o reducen una patología) para proporcionar terapia para una enfermedad cancerosa u otra afección. La dosificación preferida del agente terapéutico a administrar probablemente depende de variables tales como la gravedad del cáncer, el estado global de salud del paciente particular, la formulación de los excipientes del compuesto, y la vía de administración.

Usos terapéuticos de anticuerpos y composiciones según la invención

Los anticuerpos anti-HER3 y las composiciones farmacéuticas según la presente invención son para uso en el tratamiento o mejora de una enfermedad en un mamífero, en particular el tratamiento de cáncer en seres humanos. Una realización de la invención se refiere a anticuerpos y composiciones para uso en la prevención, tratamiento o mejora de uno o más síntomas asociados con el cáncer en un ser humano u otro mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición de anticuerpos recombinantes anti-HER3 de la presente invención a dicho mamífero.

Una realización particular se refiere a anticuerpos y composiciones para uso en el tratamiento de un paciente humano con un trastorno caracterizado por la expresión de HER3, en particular cáncer, que comprende administrar a dicho paciente un anticuerpo recombinante anti-HER3 como se define aquí, o preferiblemente una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos dos anticuerpos anti-HER3 como se define aquí.

5 También se describe un método para reducir la formación de heterodímeros entre HER3 y otros receptores de la familia de ErbB en células que expresan HER3, comprendiendo el método poner en contacto dichas células con un anticuerpo recombinante anti-HER3 como se define aquí, o preferiblemente con una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos dos anticuerpos anti-HER3 como se define aquí.

10 Una realización adicional de la presente invención es el anticuerpo recombinante anti-HER3 o la composición de anticuerpos de la presente invención para uso en el tratamiento, mejora o prevención de uno o más síntomas asociados con cáncer en un ser humano u otro mamífero, por ejemplo para el tratamiento de un paciente humano con un trastorno caracterizado por la expresión de HER3.

15 Basándonos en un número de factores, incluyendo los niveles de expresión de HER3, los siguientes tipos de tumores en particular pueden estar indicados para el tratamiento con la composición de anticuerpos de la invención: cáncer de mama, ovárico, gástrico, de colon, de recto, de próstata, de vejiga, de páncreas, de cabeza y cuello, y de pulmón no microcítico. Se contempla que las composiciones de anticuerpos de la invención son particularmente aplicables al tratamiento de cánceres que expresan HER3, por ejemplo ciertos cánceres epiteliales tales como muchos cánceres de mama, cánceres ováricos y cánceres gástricos (de estómago).

20 En relación con cada una de estas indicaciones, se contemplan dos rutas clínicas principales, a saber, 1) terapia adyuvante en relación con al menos un tratamiento terapéutico adicional, o 2) como una monoterapia. Estas dos opciones se explican brevemente a continuación.

25 1) Terapia adyuvante: En terapia adyuvante, también conocida como terapia de combinación, los pacientes se tratarán con anticuerpos de la presente invención en combinación con al menos un tratamiento terapéutico adicional, típicamente un agente quimioterapéutico o antineoplásico y/o terapia de radiación. Como alternativa, o adicionalmente, los anticuerpos anti-HER3 y composiciones de la invención también se pueden usar en combinación con un anticuerpo contra el cáncer diferente, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra EGFR o VEGF. Las dianas de cánceres primarios enumeradas anteriormente se pueden tratar así mediante administración de un anticuerpo o composición de la invención, además de una terapia estándar de primera línea y de segunda línea. Los diseños de protocolo abordarán la efectividad según se evalúa, por ejemplo, mediante la reducción en la masa tumoral, así como la capacidad para reducir las dosis habituales de la quimioterapia estándar. Tales reducciones de las dosis permitirán una terapia adicional y/o prolongada reduciendo la toxicidad del agente quimioterapéutico relacionada con la dosis.

35 Al combinar las composiciones de anticuerpos de la invención con agentes que se sabe inducen diferenciación terminal de células cancerosas, el efecto se puede mejorar aún más. Tales compuestos se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en ácido retinoico, ácidos trans-retinoicos, ácidos cis-retinoicos, butirato de fenilo, factor de crecimiento de nervios, dimetilsulfóxido, forma activa de la vitamina D3, receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas, 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol, hexametileno-bis-acetamida, factor beta de crecimiento transformante, ácido butírico, AMP cíclico, y vesnarinona. Preferiblemente, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en ácido retinoico, butirato de fenilo, ácido todo-trans-retinoico, forma activa de la vitamina D.

40 Los artículos farmacéuticos que comprenden una composición de anticuerpos de la invención y al menos un compuesto quimioterapéutico o antineoplásico se pueden usar como tratamiento de combinación para la administración simultánea, separada o sucesiva en terapia contra el cáncer. El compuesto quimioterapéutico puede ser cualquier agente quimioterapéutico adecuado para el tratamiento del cáncer particular en cuestión, por ejemplo un agente seleccionado del grupo que consiste en agentes alquilantes, por ejemplo derivados del platino, tales como cisplatino, carboplatino u oxaliplatino; alcaloides vegetales, por ejemplo paclitaxel, docetaxel o irinotecán; antibióticos antitumorales, por ejemplo doxorubicina (adriamicina); inhibidores de topoisomerasas, tales como topotecán; y antimetabolitos, por ejemplo fluorouracilo u otras fluoropirimidinas.

45 También se contempla que los anticuerpos de la invención se pueden usar en terapia adyuvante en relación con inhibidores de tirosina cinasas (TKIs). Éstos son moléculas sintéticas de bajo peso molecular, principalmente derivadas de quinazolina, que interactúan con el dominio de tirosina cinasa intracelular de los receptores e inhiben la fosforilación del receptor inducida por ligandos, al competir por el sitio de unión a Mg-ATP intracelular. Actualmente están en desarrollo clínico varios inhibidores de tirosina cinasas que bloquean receptores de la familia de EGFR. Para un repaso de estos TKIs, véase Spector et al. (2007) Breast Cancer Res. 9(2): 205. Los artículos farmacéuticos que comprenden una composición de anticuerpos de la invención y al menos un TKI dirigido contra HER3 también se pueden usar de este modo como un tratamiento de combinación para la administración simultánea, separada o sucesiva en terapia contra el cáncer.

En otras realizaciones, las composiciones de anticuerpos de la presente invención se pueden usar en combinación con otras terapias de anticuerpos. Los ejemplos de éstos incluyen, por ejemplo, anticuerpos contra EGFR (Erbix® o Vectibix®) o VEGF (Avastin®), así como otros anticuerpos anti-RTK, por ejemplo uno o más anticuerpos contra una o más dianas de RTK tales como HER2 o MET. En todavía otras realizaciones, las composiciones de anticuerpos de la presente invención se pueden usar en combinación con un agente que se sabe que estimula las células del sistema inmune, conduciendo tal tratamiento de combinación a una mejora potenciada mediada por el sistema inmune de la eficacia de las composiciones de anticuerpos de la invención. Los ejemplos de tales agentes que estimulan el sistema inmune incluyen interleucinas recombinantes (por ejemplo, IL-21 e IL-2).

2) Monoterapia: En relación con el uso de los anticuerpos según la presente invención en monoterapia de tumores, los anticuerpos se pueden administrar a pacientes sin el uso concurrente de un agente quimioterapéutico o antineoplásico, es decir, como una terapia autónoma.

Inmunoconjugados

Otra opción para uso terapéutico de los anticuerpos y composiciones de la invención es en forma de inmunoconjugados, es decir, anticuerpos conjugados a uno o más agentes contra el cáncer. En particular, en el caso de composiciones que comprenden dos o más anticuerpos individuales de la invención que se unen a distintos epítopos de HER3, se contempla que esto puede generar una red reticulada de anticuerpo-receptor en la superficie celular, dando potencialmente de ese modo como resultado un mayor nivel de internacionalización del receptor en comparación con el uso de un solo anticuerpo monoclonal. La conjugación de uno o más de los anticuerpos individuales de tal composición a uno o más agentes contra el cáncer tiene por lo tanto el potencial de suministrar específica y eficazmente los agentes contra el cáncer conjugados hacia interior de las células tumorales, aumentando de ese modo el efecto de los anticuerpos anti-HER3 de la invención para proporcionar una actividad de exterminio de células tumorales mejorada.

Diversos tipos de agentes contra el cáncer se pueden conjugar a los anticuerpos de la invención, incluyendo agentes citotóxicos (incluyendo agentes quimioterapéuticos convencionales y otros fármacos anticancerosos de tipo pequeña molécula), citocinas (en cuyo caso el conjugado se puede denominar una "inmunocitocina"), toxinas (en cuyo caso el conjugado se puede denominar una "inmunotoxina") y radionúclidos, y ya se han aprobado para uso clínico unos pocos inmunoconjugados. Éstos incluyen Zevalin® (un anticuerpo murino anti-CD20 conjugado con ⁹⁰Y), Bexxar® (un anticuerpo murino anti-CD20 conjugado con ¹³¹I) y Mylotarg® (un anticuerpo humanizado anti-CD33 conjugado con caliqueamicina). Otros inmunoconjugados que se han estudiado en ensayos clínicos incluyen anticuerpos conjugados con, por ejemplo, doxorubicina o un compuesto de maitansinoide. Las inmunotoxinas que se han estudiado en ensayos clínicos incluyen varios anticuerpos conjugados con una enterotoxina A de *Pseudomonas* truncada. También se ha ensayado una inmunocitocina que comprende un anticuerpo humanizado anti-EpCAM conjugado con IL-2.

En el caso de anticuerpos de la invención conjugados con agentes citotóxicos, éstos pueden pertenecer, por ejemplo, a cualquiera de las clases principales de fármacos quimioterapéuticos, incluyendo agentes alquilantes (por ejemplo carboplatino, cisplatino, oxaliplatino), antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, capecitabina, gemcitabina), antraciclinas (por ejemplo bleomicina, doxorubicina, mitomicina-C), y alcaloides vegetales (por ejemplo taxanos tales como docetaxel y paclitaxel, y alcaloides de vinca tales como vinblastina, vincristina y vinorelbina). Puesto que el uso de los inmunoconjugados dirige específicamente el agente anticanceroso contra los tumores, y en particular hacia el interior de las células tumorales tras la internalización, los inmunoconjugados basados en los anticuerpos anti-HER3 de la invención se pueden basar ventajosamente en agentes muy citotóxicos tales como caliqueamicina o derivados de maitansina, o basados en toxinas tales como toxinas bacterianas (por ejemplo exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina de la difteria) o toxinas vegetales (por ejemplo ricina).

El agente anticanceroso conjugado en un inmunoconjugado está enlazado generalmente al anticuerpo por medio de un enlazador lábil que es relativamente estable en suero, pero que permite la liberación del agente cuando el inmunoconjugado se internaliza en la célula diana. Los enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores químicos, que son estables a pH neutro en suero pero que se someten a hidrólisis ácida en condiciones levemente ácidas en los lisosomas tras la internalización, los enlazadores de disulfuro, que se escinden mediante tioles intracelulares, y los enlazadores peptídicos, que son estables en suero pero que se someten a escisión enzimática en compartimientos intracelulares.

En las composiciones que contienen dos o más anticuerpos de la invención se pueden idear diversas disposiciones de la conjugación. Por ejemplo, con dos anticuerpos, sería posible conjugar los anticuerpos a dos o más fármacos anticancerosos diferentes, o conjugar un anticuerpo a un profármaco que se activa mediante un agente tal como una enzima conjugada al otro anticuerpo.

El concepto general de terapia con profármacos dirigidos contra complejos de anticuerpos unidos a enzimas (ADEPT) se ha descrito para anticuerpos monoclonales, en el que un profármaco es activado por una enzima dirigida hacia el tumor mediante un conjugado de mAB-enzima, pero la presente invención puede proporcionar la

oportunidad de personalizar este enfoque a condiciones particulares. De este modo, puede ser posible incrementar específicamente la muerte de células tumorales a la vez que se economiza o se reduce el daño a tejidos normales.

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

Dosis y vía de administración

Los anticuerpos y composiciones de la invención se administrarán en una cantidad eficaz para el tratamiento de la afección en cuestión, es decir, a dosis y durante períodos de tiempo necesarios para lograr un resultado deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar según factores tales como la afección particular que se esté tratando, la edad, sexo y peso del paciente, y si los anticuerpos anti-HER3 son administrados como un tratamiento autónomo o en combinación con uno o más tratamientos contra el cáncer adicionales.

Una cantidad eficaz para la terapia tumoral se puede medir mediante su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad y/o mejorar los síntomas en un paciente, y preferiblemente para invertir la progresión de la enfermedad, por ejemplo reduciendo el tamaño del tumor. La capacidad de un anticuerpo o composición de la invención para inhibir el cáncer se puede evaluar mediante ensayos *in vitro*, por ejemplo como se describe en los ejemplos, así como en modelos de animales adecuados que predicen la eficacia en tumores humanos. Se seleccionarán regímenes de dosificación adecuados a fin de proporcionar una respuesta terapéutica óptima en cada situación particular, por ejemplo administrada como un único bolo o como una infusión continua, y con ajuste posible de la dosis según se indique por las exigencias de cada caso.

Aunque no se ha determinado todavía la dosificación específica para anticuerpos según la invención, se pueden determinar ciertas consideraciones de la dosificación a través de la comparación con un producto similar (por ejemplo un anticuerpo monoclonal dirigido contra HER2 o EGFR) que ha sido aprobado para uso terapéutico. De este modo, se contempla que una dosis apropiada de una composición de anticuerpos de la invención será similar a la dosis recomendada para el anticuerpo monoclonal anti-HER2 trastuzumab (Herceptin®) o el anticuerpo monoclonal anti-EGFR panitumumab (Vectibix®). Dependiendo de la afección particular, Herceptin® se administra (por medio de infusión) para el tratamiento de cáncer de mama a una dosis inicial de 4 mg/kg y dosis semanales subsiguientes de 2 mg/kg, o una dosis inicial de 8 mg/kg, y dosis subsiguientes de 6 mg/kg cada tres semanas, mientras que Vectibix® se administra a una dosis de 6 mg/kg cada 14 días.

Se contempla que una dosis adecuada de una composición de anticuerpos de la invención estará en el intervalo de 0,1-100 mg/kg, tal como alrededor de 0,5-50 mg/kg, por ejemplo alrededor de 1-20 mg/kg. Las composiciones de anticuerpos se pueden administrar, por ejemplo, en una dosis de al menos 0,25 mg/kg, por ejemplo al menos 0,5 mg/kg, tal como al menos 1 mg/kg, por ejemplo al menos 1,5 mg/kg, tal como al menos 2 mg/kg, por ejemplo al menos 3 mg/kg, tal como al menos 4 mg/kg, por ejemplo al menos 5 mg/kg; y por ejemplo hasta como máximo 50 mg/kg, tal como hasta como máximo 30 mg/kg, por ejemplo hasta como máximo 20 mg/kg, tal como hasta como máximo 15 mg/kg. La administración se repetirá normalmente a intervalos adecuados, por ejemplo una vez cada semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas, y durante un tiempo tan prolongado como se considere apropiado por el médico responsable, quien puede incrementar o disminuir opcionalmente la dosificación según sea necesario.

Para el suministro de los anticuerpos de la invención se contemplan tres enfoques de suministro distintos. El suministro intravenoso convencional será presumiblemente la técnica de suministro estándar para la mayoría de tumores. Sin embargo, en relación con tumores en la cavidad peritoneal, tales como tumores de los ovarios, conducto biliar, otros conductos, y similares, la administración intraperitoneal puede probar ser favorable para obtener una dosis elevada de anticuerpo en el tumor y minimizar el aclaramiento del anticuerpo. De forma similar, ciertos tumores sólidos poseen una vasculatura que es apropiada para la perfusión regional. La perfusión regional puede permitir obtener una dosis elevada del anticuerpo en el sitio de un tumor y minimizar el aclaramiento a corto plazo del anticuerpo.

Al igual que con cualquier producto terapéutico basado en infusión de proteínas o de anticuerpos, los problemas de seguridad están relacionados principalmente con (i) síndrome de liberación de citocinas, es decir, hipotensión, fiebre, temblores, escalofríos, (ii) el desarrollo de una respuesta inmunógena contra la proteína (es decir, desarrollo de anticuerpos humanos por el paciente contra el producto de anticuerpo recombinante), y (iii) toxicidad contra células normales que expresan el receptor de HER3. Para monitorizar cualesquiera de tales problemas de seguridad, se utilizan ensayos estándar y procedimientos de seguimiento.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Clonación de anticuerpos anti-HER3

Inmunización

Para las inmunizaciones, se usaron tres ratones hembra, un ratón BALB/cJ, un ratón C57BL/6, y un ratón C3H (8-10 semanas). Los ratones se inmunizaron con la proteína HER3 comercialmente disponible (R&D Systems nº de catálogo 348-RB). Para las primeras cuatro inmunizaciones, la proteína HER3 se diluyó en PBS y se mezcló 1:1 (v/v) con adyuvante de Freund. Las inmunizaciones quinta y final se administraron sin adyuvante con la proteína HER3 en PBS.

El adyuvante se usa para potenciar y modular la respuesta inmune. En la primera inmunización se usó adyuvante completo de Freund (CFA), mientras que para la segunda, tercera y cuarta inmunización se usó adyuvante incompleto de Freund (IFA). IFA es una emulsión de aceite en agua compuesta de aceites minerales, y CFA es IFA con las especies añadidas de *Mycobacterium* deshidratadas, destruidas por calor. Ambos adyuvantes tienen un efecto de depósito. La micobacteria en CFA da como resultado una fuerte activación del sistema inmune, lo que conduce a una persistencia a largo plazo de la respuesta inmune. Solamente se administraron a los ratones emulsiones estables.

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

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical, y se recogieron los bazos y los ganglios linfáticos inguinales. Se prepararon suspensiones monocelulares macerando a través de un filtro celular de 70 µm (Falcon, BD Biosciences, nº de catálogo 352350). Las células procedentes de los tres ratones se reunieron, se resuspendieron en RPMI-1640 frío con 10% de FBS, y se centrifugaron.

Tabla 4: Resumen de inmunizaciones.

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

Clasificación mediante FACS de células plasmáticas murinas

Para eliminar los glóbulos rojos, la suspensión celular reunida se lisó en NH₄Cl 0,17 M. Después de la lisis, las células se lavaron dos veces en FBS 2%/PBS. Las células se resuspendieron en 1 ml de FBS 2%/PBS, se incubaron con Fc-block (anti-CD16/CD32 de ratón, BD Biosciences, nº de cat. 553141), y se lavaron una vez. Después de la resuspensión en FBS 2%/PBS, las células se tiñeron con anti-CD43 de ratón-FITC (BD Biosciences, nº de cat. 553270), anti-CD138 de ratón-PE (BD Biosciences, nº de cat. 553714), anti-IgM de ratón-Horizon (BD Biosciences, nº de cat. 560575), anti-IgG1 de ratón-APC (BD Biosciences, nº de cat. 550874), anti-MHC II (I-A/I-Ed) de ratón-biotina (BD Biosciences, nº de cat. 553622) y anti-B220/CD45R de ratón-PerCP (BD Biosciences, nº de cat. 553093) durante 20 minutos en la oscuridad. Las células se lavaron, se incubaron con Estreptavidina-APC-Cy7 (BD Biosciences, nº de cat. 554063) durante 20 minutos, y se lavaron. Las células se clasificaron mediante FACS en un clasificador de células FACS Aria™. Las células que fueron B220^{low}MHCII^{int}CD43⁺CD138⁺IgM⁻ se clasificaron como monocélulas en placas de microtitulación de 384 pocillos que contenían amortiguador de reacción de PCR. Las placas se centrifugaron, se congelaron y se almacenaron a -80°C.

Enlace de pares de V_H y V_L similares

El enlazamiento de las secuencias codificantes de V_H y V_L se realizó en las células individuales acotadas como células plasmáticas, facilitando el apareamiento similar de las secuencias codificantes de V_H y V_L. El procedimiento utilizó un procedimiento de PCR de dos etapas basado en una RT-PCR de extensión del solapamiento múltiple de una sola etapa, seguido de una PCR anidada. Las mezclas de cebadores usadas en el presente ejemplo únicamente amplifican las cadenas ligeras kappa. Sin embargo, si se desea, se podrían añadir cebadores capaces de amplificar las cadenas ligeras lambda a la mezcla de cebadores múltiples y a la mezcla de cebadores de PCR anidada. Si se añaden cebadores lambda, el procedimiento de clasificación debe ser adaptado de tal forma que las

células lambda positivas no se excluyen. El principio para el enlazamiento de las secuencias V_H y V_L similares se describe con detalle en el documento WO 2005/042774 y en Meijer et al. (2006) J Mol Biol. 358(3):764-72.

Se descongelaron placas de PCR de 96 pocillos, y las células clasificadas sirvieron como molde para la RT-PCR de extensión del solapamiento múltiple. El amortiguador de clasificación añadido a cada pocillo antes de la clasificación de las células individuales contenía amortiguador de reacción (amortiguador OneStep RT-PCR; Qiagen), cebadores para RT-PCR, e inhibidor de ARNasa (RNasin, Promega). Los cebadores usados para la RT-PCR de extensión del solapamiento, así como las concentraciones de cebador, fueron las mismas que las mostradas en la Tabla 3 del documento WO 2008/104183. Esto se suplementó con la mezcla OneStep RT-PCR5Enzyme (dilución 25x; Qiagen) y la mezcla de dNTP (200 μ M cada uno) para obtener la concentración final dada, en un volumen de reacción de 20 μ l. Las placas se incubaron durante 30 minutos a 55°C para permitir la transcripción inversa (RT) del ARN de cada célula. Después de la RT, las placas se sometieron al siguiente ciclo de PCR: 10 minutos a 94°C, 35x (40 segundos a 94°C, 40 segundos a 60°C, 5 minutos a 72°C), 10 minutos a 72°C.

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

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

Los reportorios de los pares codificantes de V_H y V_L enlazados procedentes de la PCR anidada se combinaron, sin mezclar los pares de diferentes donantes, y se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, preparativa. La secuencia codificante de la cadena ligera constante kappa humana se ajustó mediante extensión del solapamiento a la región codificante de V_L de los productos de PCR combinados de los pares codificantes V_H y V_L enlazados, como se describe en el documento WO 2008/104183. La secuencia codificante de la cadena ligera constante kappa humana se amplificó a partir de un plásmido que contenía la secuencia codificante de un anticuerpo humano con una cadena ligera kappa en una reacción que contenía: Enzima Phusion (2 U; Finnzymes), amortiguador Phusion 1x, mezcla de dNTP (200 μ M cada uno), cebador hKCforw-v2, y el cebador Kappa3' (véanse en la Tabla 5 del documento WO 2008/104183 los cebadores y las concentraciones empleadas), y el molde de plásmido pLL138 (10 ng/ μ l) en un volumen total de 50 μ l. La reacción se sometió al siguiente ciclo térmico: 25x (30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 45 segundos a 72°C), 10 minutos a 72°C. El fragmento de la PCR resultante se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% preparativa.

Los fragmentos de la PCR combinados purificados, procedentes de cada repertorio, se ajustaron al fragmento de PCR amplificado y purificado de la región codificante constante kappa humana (SEQ ID NO: 42) mediante el siguiente ajuste por PCR de extensión del solapamiento (50 μ l de volumen total) que contenía: el fragmento de la región codificante constante kappa humana (1,4 ng/ μ l), el fragmento de PCR combinado purificado (1,4 ng/ μ l), ADN-polimerasa Phusion (0,5 U; Finnzymes), y la Mezcla Enzimática de Alta Fidelidad FastStart (0,2 U; Roche), amortiguador FastStart (Roche) 1x, mezcla de dNTP (200 μ M cada uno), el cebador mhKCreV, y los cebadores del conjunto mJH (véase la Tabla 5 del documento WO 2008/104183 para los cebadores y las concentraciones empleadas). La reacción se sometió al siguiente ciclo térmico: 2 minutos a 95°C, 25x (30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C), 10 min a 72°C. El fragmento de la PCR resultante (aproximadamente 4518 pb) se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% preparativa.

Inserción de los pares codificantes de V_H y V_L similares en un vector de cribado

Con el fin de identificar los anticuerpos con especificidad de unión por HER3, las secuencias codificantes de V_H y V_L obtenidas se expresaron como anticuerpos de longitud completa. Esto implicó la inserción del repertorio de los pares codificantes de V_H y V_L dentro de un vector de expresión, y la transfección en una célula hospedante.

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

De forma breve, los productos de la PCR purificados de los repertorios de los pares codificantes de V_H y V_L enlazados, ajustados a la región codificante constante kappa humana, se escindieron con las endonucleasas de ADN *XhoI* y *NotI* en los sitios de reconocimiento introducidos en los extremos de los productos de la PCR. Los fragmentos escindidos y purificados se ligaron en un vector de expresión de IgG de mamífero digerido con *XhoI/NotI*, 00-VP-002 (descrito en el documento WO 2008/104183), mediante procedimientos convencionales de ligación. La mezcla de ligación se sometió a electroforesis en *E. coli*, y se añadió a placas 2xYT que contenían el antibiótico apropiado, y se incubaron a 37°C toda la noche. El repertorio amplificado de vectores se purificó a partir de las células recuperadas de las placas usando los métodos de purificación de ADN convencionales (Qiagen). Los plásmidos se prepararon para la inserción de los fragmentos del promotor líder mediante escisión usando las endonucleasas *Ascl* y *NheI*. Los sitios de restricción para estas enzimas estaban localizados entre los pares de genes codificantes de V_H y V_L. Después de la purificación del vector, se insertó un fragmento del promotor líder de mamífero, bidireccional, digerido con *Ascl-NheI*, en los sitios de restricción de *Ascl* y *NheI* mediante procedimientos de ligación convencionales. El vector ligado se amplificó en *E. coli*, y el plásmido se purificó usando métodos convencionales. El repertorio generado de vectores de cribado se transformó en *E. coli* mediante procedimientos convencionales. Las colonias obtenidas se consolidaron en placas maestras de 384 pocillos, y se almacenaron.

Para la amplificación de los plásmidos de expresión de mamífero, se empleó un procedimiento de dos etapas. En primer lugar, las bacterias se sometieron a lisis, y el ADN se desnaturizó por incubación en hidróxido de sodio. Posteriormente, se realizó la amplificación TempliPhi (GE Amersham). Este método utiliza la ADN polimerasa del bacteriófago $\Phi 29$ para amplificar exponencialmente los moldes de ADN circulares bicatenarios mediante amplificación de círculo rodante. Para la expresión del anticuerpo en células de mamífero, se aplicó el sistema de expresión 293Freestyle™ (Invitrogen), usando las condiciones de transfección estándar según las recomienda el fabricante. Las células se suplementaron con valproato hasta 50 mM antes de la transfección, y al día siguiente se añadió Tryptone N1 hasta una concentración final de 1,5% (p/v) del volumen de transfección. Los sobrenadantes que contenían los anticuerpos se cosecharon seis días después de la transfección. Los niveles de expresión se estimaron con ELISA anti-IgG estándar.

Cribado para determinar la unión a la proteína HER3 recombinante (ELISA)

La especificidad del anticuerpo se determinó mediante ELISA usando como antígeno la proteína HER3 recombinante.

En resumen, se revistieron placas Nunc Maxisorb (nº de cat. 464718) con 1 µg/ml de proteína HER3 (R&D Systems, nº de cat. 348-RB), diluida con PBS a 4°C toda la noche. Antes del bloqueo en 50 µl de leche al 2%-PBS + Tween 20 al 0,05%, las placas se lavaron una vez con PBS-T. Las placas se lavaron una vez con PBS-T y 20 µl de leche al 2%-PBS-T, y se añadieron 10 µl de sobrenadantes de los transfectantes FreeStyle293, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual las placas se lavaron una vez con PBS-T, 20 µl por pocillo. Se añadió anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-cadena ligera kappa humana-HRP, Serotec, nº de cat. STAR 100P), diluido 1:25000 en leche al 2%-PBS-T, para detectar los anticuerpos unidos a los pocillos, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron una vez en PBS-T antes de la adición de 25 µl del sustrato (Kem-En-Tec Diagnostics, nº de cat. 4518), que se incubó durante 5 minutos. Se añadieron 25 µl de ácido sulfúrico 1M después de la incubación, para detener la reacción. La señal específica se detectó en un lector de ELISA a 450 nm. A partir de los datos de ELISA, se identificaron 480 clones de anticuerpos positivos, y se seleccionaron para el análisis de secuencias y validación de la unión a HER3.

Análisis de secuencias y selección de clones

Los clones identificados como unidos a HER3 mediante ELISA se recuperaron a partir de las placas maestras originales (formato de 384 pocillos) y se rayaron sobre placas de agar para generar colonias individuales, las cuales se llevaron después a cultivos de medio LB y se incubaron a 37°C toda la noche con agitación vigorosa. El ADN plasmídico se aisló de los clones utilizando el kit Qiaprep 96 turbo miniprep (Qiagen, nº de cat. 27193), y se sometió a secuenciación del ADN de los genes V. Las secuencias se alinearon, y se seleccionaron todos los clones únicos. Múltiples alineaciones de las secuencias obtenidas revelaron el carácter único de cada clon particular, y permitieron la identificación de los anticuerpos únicos. Tras el análisis de las secuencias de los clones secuenciados, se identificaron 33 agrupamientos de secuencias relacionadas con dos hasta alrededor de 40 miembros, así como alrededor de 20 clonotipos que estaban representados solamente una vez. Cada agrupamiento de secuencias relacionadas derivó probablemente a través de hipermutaciones somáticas de un clon precursor común. En general, para la validación de la secuencia y la especificidad, se escogieron uno a dos clones procedentes de cada agrupamiento. Basándose en el análisis de agrupamientos, se seleccionaron 119 clones para la expresión a pequeña escala y la caracterización posterior. Las secuencias de las regiones variables de los anticuerpos seleccionados se muestran en el listado de secuencias anexo. Como se explica anteriormente, las secuencias de la cadena ligera mostradas en el listado de secuencias incluyen todas ellas la misma región constante kappa humana, que comienza con los aminoácidos -TVAAP- y termina en el -NRGEC C-terminal. Con el fin de validar los clones que codifican el anticuerpo, se preparó plásmido de ADN, y se realizó la transfección de las células CHO-S FreeStyle (Invitrogen) a escala de 2 ml para la expresión. Los sobrenadantes se cosecharon 6 días después de la transfección. Los niveles de expresión se estimaron con ELISA estándar anti-IgG, y la especificidad se determinó por ELISA

específico de HER3, como se describe anteriormente en “Cribado para determinar la unión a la proteína HER3 recombinante” y mediante microscopía confocal de cribado de alto rendimiento de la unión del anticuerpo a células que sobreexpresan HER3 (véase más adelante).

Cribado para determinar la unión a células que sobreexpresan HER3 (OPERA)

5 Los 119 clones se cribaron para determinar la unión a la estirpe de células cancerosas de mama que sobreexpresan HER3 (MCF-7) usando microscopía confocal. Se sembraron 10.000 células MCF-7 en cada pocillo de placas portadoras de células de 384 pocillos (Perkin Elmer, nº de cat. 6007439), y se dejaron adherir toda la noche. Los medios se desecharon nuevamente, y las células se lavaron y se fijaron con disolución de formaldehído al 2% (Aldrich, nº de cat. 533998). Después del lavado, se transfirieron 40 µl del sobrenadante de anticuerpos a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 2 horas, después de lo cual el medio en los pocillos se desechó y se añadieron a cada pocillo 30 µl del nuevo medio que contenía 2 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-IgG humana marcado con Alexa-488 (H+L, Invitrogen, nº de cat. A11013), 2 µg/ml de Azul CellMask (Invitrogen, nº de cat. H34558) y Hoechst 33342 1 µM (Invitrogen, nº de cat. H3570), y las placas se incubaron durante otros 30 minutos. El nivel de fluorescencia se midió a continuación usando un microscopio confocal de alto rendimiento OPERA (Perkin Elmer).

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

Ejemplo 2: Caracterización funcional de anticuerpos anti-HER3 seleccionados

20 Se seleccionaron 67 anticuerpos únicos para el ensayo funcional usando un ensayo de viabilidad. El daño celular dará inevitablemente como resultado la capacidad de las pérdidas para mantener y proporcionar energía para la función celular metabólica y el crecimiento. Los ensayos de actividad metabólica se basan en esta premisa, midiendo habitualmente la actividad mitocondrial. El reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche, nº de cat. 11 644 807 001) es un sustrato listo para el uso que mide la actividad metabólica de células viables. En este ejemplo, se usó el ensayo de WST-1 para medir el número de células metabólicamente activas tras el tratamiento de células cancerosas con 2 µg/ml de diferentes anticuerpos anti-HER3 durante 96 horas.

25 Las estirpes de células cancerosas MDA-MB-175 (ATCC nº de cat. HTB-25), A431NS (ATCC nº de cat. CRL-2592), MCF-7 (ATCC nº de cat. HTB-22) y MDA-MB-453 (ATCC nº de cat. HTB-130) se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 1000 células/pocillo en medio que contiene 2 µg/ml de anticuerpo anti-HER3. Las placas se incubaron durante 4 días en una incubadora humidificada a 37°C. Entonces se añadieron 20 µl de reactivo WST-1 por pocillo, y las placas se incubaron durante una hora a 37°C. Las placas se transfirieron entonces a un agitador de placas orbital, y se dejaron otra hora. La absorbancia se midió a 450 nm y 620 nm (longitud de onda de referencia) en un lector de ELISA. La diferencia en los niveles de células metabólicamente activas (MAC) se calculó como porcentaje de los sobrenadantes del control como sigue:

$$\%MAC = \left(1 - \frac{(OD_{exp.} - OD_{medio})}{(OD_{sin\ trat.} - OD_{medio})} \right) \times 100$$

35 Se supone que la actividad metabólica se correlaciona con el número de células viables: un menor %MAC corresponde a un mayor nivel de inhibición del crecimiento celular por los anticuerpos.

40 Los resultados de este análisis para anticuerpos selectos se muestran en la Tabla 5 a continuación, en la que se proporciona el dato para las estirpes de células cancerosas individuales así como el nivel de la mediana de la inhibición a lo largo de las cuatro estirpes celulares. A partir de estos resultados, es evidente que se han identificado anticuerpos anti-HER3 con un intervalo de actividades funcionales, y que los anticuerpos en el repertorio exhiben un efecto inhibitor en todas o en casi todas las estirpes de células cancerosas ensayadas.

Tabla 5. Porcentaje de células metabólicamente activas (MAC) en presencia de anticuerpos anti-HER3

Nº de anticuerpo	MDA-MB-175	MCF-7 + 1 nM de Heregulina	MDA-453	A431NS	Mediana
4785	60	80	53	70	65
4889	50	76	52	80	64
4935	74	95	67	86	80
5038	78	76	65	83	77
5082	43	60	66	67	63

5101	65	88	80	82	81
5106	57	87	78	87	82
5143	73	87	69	78	75
5144	79	89	73	79	79
5259	72	90	81	77	79

Se generaron curvas de respuesta frente a la dosis para los diez anticuerpos en la Tabla 5 usando la estirpe celular MDA-MB-175, que es la más sensible a la inhibición de HER3; véanse las Figuras 1-10, que muestran la actividad metabólica de las células MDA-MB-175 tratadas con diferentes concentraciones de los anticuerpos indicados durante 96 horas. Todos los anticuerpos ensayados bloquean la proliferación de células MDA-MB-175, pero en base a los datos *in vivo* mostrados en las Figuras 1-10, los anticuerpos 5101 y 5106 parecen ser los más eficaces.

Ejemplo 3: Inhibición de la fosforilación de HER3 por anticuerpos anti-HER3

Este ejemplo demuestra que los anticuerpos anti-HER3 son capaces de inhibir la fosforilación de HER3 inducida por ligandos.

10 Métodos

A fin de investigar el nivel de fosforilación de HER3 en estirpes celulares tratadas con anticuerpos anti-HER3, se llevaron a cabo análisis de transferencia western sobre lisados de células completas de células MDA-MB-175 y MCF7 que se pretrataron con los anticuerpos durante 1 hora y después se estimularon con 10 nM de heregulina beta. Las células se hicieron crecer en matraces de cultivo T-75, y a una confluencia de 80%, los medios de cultivo se retiraron, y las células se lavaron en 1xPBS y se trataron con 10 µg/ml de los anticuerpos diluidos en 5 ml de medio que contiene 0,5% de FBS. Las células se trataron durante una hora, tras lo cual se prepararon lisados de células completas usando amortiguador de RIPA estándar. Se determinó en cada muestra la concentración de proteína total, y se analizaron 10 µg de proteína mediante transferencia western usando anticuerpo primario frente a HER3 fosforilada (pHER3).

20 Resultados

En la Figura 11 se muestran los resultados de los análisis de transferencia western de los niveles de fosfo-HER3 en las estirpes celulares MDA-MB-175 y MCF7 tras 1 hora de pretratamiento con los anticuerpos indicados, seguido de la estimulación con 10 nM de heregulina beta. Los diferentes anticuerpos anti-HER3 inhibieron en diversos grados la fosforilación de HER3 inducida por ligandos, siendo los mejores anticuerpos en este ensayo 5101, 5106, 5259 y 4889. Los anticuerpos 5038 y 5143 tuvieron solamente un efecto limitado sobre los niveles de HER3 fosforilada en estas estirpes celulares.

Ejemplo 4: Caracterización funcional de mezclas de dos anticuerpos anti-HER3

Este ejemplo describe el ensayo *in vitro* de todas las posibles mezclas de dos anticuerpos entre diez anticuerpos anti-HER3 seleccionados de la invención con unión confirmada a HER3 humana. Las mezclas de anticuerpos se evaluaron para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de cuatro estirpes de células cancerosas diferentes: MDA-MB-175, MCF7 (+ 1 nM heregulina beta), H1437 (+ 1 nM heregulina beta) y A431NS (1 µg/ml de mezcla 992+1024 anti-EGFR). La mezcla 992+1024 anti-EGFR contiene cantidades iguales de los dos anticuerpos anti-EGFR denominados 992 y 1024, como se describe en el documento 2008/104183.

Métodos

Los anticuerpos 4785, 4889, 4935, 5038, 5082, 5101, 5106, 5143, 5144 y 5259, cada uno de los cuales tenía confirmada la unión al receptor de HER3 humano, se ensayaron en todas las posibles mezclas de dos anticuerpos a fin de identificar mezclas de anticuerpos con eficacia óptima. Los métodos usados, por ejemplo para preparar las diferentes combinaciones de anticuerpos en las placas de 384 pocillos, fueron los descritos generalmente en el documento WO 2010/040356. Más abajo se proporcionan detalles adicionales.

40 Mezclas de dos anticuerpos

Los diez anticuerpos se diluyeron hasta una concentración de 25 µg/ml en 1xPBS, y se añadieron 100 µl de disolución de anticuerpos a los pocillos de placas alimentadoras de 384 pocillos, para uso en la preparación de mezclas de dos anticuerpos para el ensayo.

Para cada una de las cuatro estirpes celulares ensayadas, se usaron dos placas de 384 pocillos separadas, añadiéndose a los pocillos 46 µl de medio que contiene células. Se usó una estación de trabajo automatizada de

laboratorio Biomek 3000 (Beckman Coulter) para añadir 2 µl de cada uno de los dos anticuerpos diferentes procedentes de las placas alimentadoras a los pocillos de las placas de 384 pocillos que contienen medio + células, de tal manera que estaban representadas todas las combinaciones de dos anticuerpos diferentes. Además, las placas incluyeron pocillos de control con medio (50 µl de medio 1xPBS; sin células), pocillos de control no tratados (50 µl de medio 1xPBS + células; sin anticuerpos), y pocillos que contienen (además de 46 µl de medio + células) 4 µl de medio con solamente uno de los diez anticuerpos de la invención como control adicional.

Las placas con los pocillos que contienen mezclas de dos anticuerpos, así como los pocillos de control con medio y sin tratar, o un solo anticuerpo de la invención, se incubaron durante 4 días en una incubadora humidificada a 37°C, después de lo cual se añadieron a todos los pocillos relevantes en las placas 5 µl del reactivo de proliferación celular WST-1 diluido 1:1 en 1xPBS. Las placas se incubaron entonces durante 1 hora a 37°C, y se transfirieron subsiguientemente a agitadores orbitales y se incubaron durante otra hora. La absorbancia se midió a 450 nm y 620 nm (longitud de onda de referencia) en un lector de ELISA. La cantidad de células metabólicamente activas (MAC) se calculó como se describió en el Ejemplo 2.

Se generaron curvas de respuesta frente a la dosis para las mezclas seleccionadas (destacadas en negrita en la Tabla 6 a continuación) usando las estirpes celulares MDA-MB-175 y MCF-7. Antes de llevar a cabo el ensayo de WST-1, los anticuerpos apropiados y las mezclas de anticuerpos se diluyeron hasta una concentración total final de anticuerpos de 100 µg/ml en medio apropiado suplementado con 2% de FBS y 1% de penicilina/estreptomina (P/S), produciendo una concentración total final de anticuerpos de 50 µg/ml en el pocillo que contiene la concentración más elevada de anticuerpos. Entonces se llevó a cabo una dilución en serie de dos veces de los anticuerpos. Entonces se añadieron los números relevantes de células a los pocillos experimentales en una placa de 384 pocillos. Las placas se incubaron durante 4 días en una incubadora humidificada a 37°C. La cantidad de células metabólicamente activas (MAC) se calculó como el porcentaje del control no tratado como se describe en el Ejemplo 2.

Resultados

Los anticuerpos individuales y las mezclas de dos anticuerpos se clasificaron según su efecto de la mediana sobre el crecimiento celular, calculado como %MAC. Los resultados se muestran más abajo en la Tabla 6.

Los resultados muestran que el nivel de inhibición del crecimiento por las diversas mezclas varía considerablemente entre las diferentes estirpes celulares, mientras que la diferencia en el %MAC de la mediana es menos pronunciada. Se encontró que el anticuerpo monoclonal 5082 tiene el nivel más elevado de inhibición del crecimiento de la mediana (%MAC más bajo), mientras que varias mezclas de anticuerpos son superiores inhibiendo la estirpe celular MDA-MB-175. Se debería observar que aunque los anticuerpos y mezclas de anticuerpos en la Tabla 6 se clasifican basándose en el %MAC de la mediana para las cuatro estirpes celulares, se contempla que pueden ser de interés mezclas de anticuerpos individuales basado en el efecto demostrado en una cualquiera o más estirpes celulares, y que un nivel elevado de inhibición (%MAC bajo) en justamente una sola estirpe celular se puede traducir en una combinación de anticuerpos muy útil *in vivo* frente a ciertos tipos de cánceres.

Se generaron curvas de respuesta frente a la dosis para mezclas de dos anticuerpos que se unen a epítomos no solapantes de HER3 y combinaciones de agrupamientos de epítomos únicas (destacadas en negrita). Los resultados muestran que todas las muestras inhiben las cuatro estirpes celulares, aunque con diferente potencia.

Tabla 6. Nivel de inhibición del crecimiento de células cancerosas mediante mezclas de dos anticuerpos anti-HER3 en las cuatro estirpes de células cancerosas MDA-MB-175, MCF7, H1437 y A431NS. El nivel de inhibición se muestra como % de células metabólicamente activas (%MAC).

	MDA-MB-175		MCF7 +1 nM de Heregulina beta		H1437 + 1 nM de Heregulina beta		A431NS + 1 µg/ml de Sym004*		Mediana
	%MAC	SD	%MAC	SD	%MAC	SD	%MAC	SD	%MAC
5082	42,7	4,6	55,2	3,5	69,4	5,2	74,5	5,1	62,3
5082+5106	37,1	5,9	55,2	0,9	77,1	3,9	82,9	6,1	66,1
5082+4889	47,5	7,3	65,8	4,4	72,3	4,7	77,7	6,7	69,0
5082+5101	43,7	11,3	61,6	7,7	76,8	9,8	84,4	8,3	69,2
5082+5259	52,7	3,2	59,3	10,4	79,1	4,5	90,0	8,4	69,2
5082+4935	45,9	5,1	58,7	7,8	79,8	7,2	90,0	8,8	69,2
5082+4785	45,5	10,9	61,9	8,6	77,1	8,5	87,7	10,3	69,5

ES 2 692 379 T3

	MDA-MB-175		MCF7 +1 nM de Heregulina beta		H1437 + 1 nM de Heregulina beta		A431NS + 1 µg/ml de Sym004*		Mediana
	%MAC	SD	%MAC	SD	%MAC	SD	%MAC	SD	%MAC
5082+5143	51,5	4,3	65,4	10,3	75,1	4,2	84,2	5,0	70,2
5082+5144	49,3	5,1	60,8	9,8	80,0	4,2	86,1	6,6	70,4
5082+5038	32,2	7,7	62,7	11,2	79,0	5,6	90,2	8,8	70,9
5038+4889	39,9	6,9	69,2	8,6	77,2	10,2	90,4	13,1	73,2
4785+4889	37,0	1,0	65,2	2,4	81,8	5,1	96,5	14,4	73,5
4935+4889	47,2	9,9	73,3	6,4	82,7	7,3	86,6	11,8	78,0
4889+5143	44,5	2,3	76,1	1,9	82,3	2,4	89,9	8,1	79,2
5038+5143	67,3	6,5	75,3	2,7	84,0	6,4	90,1	9,5	79,6
4889+5259	53,6	4,9	78,2	2,7	81,2	4,3	87,0	8,3	79,7
4785+5038	47,9	6,0	74,2	10,8	86,7	4,8	100,4	2,3	80,5
4785+5259	63,1	10,6	77,1	9,6	83,9	11,3	98,9	4,2	80,5
5106+4889	47,1	3,0	78,4	3,5	83,7	4,6	90,0	8,0	81,1
5101+4889	51,3	5,2	82,3	5,7	84,7	6,0	82,3	14,1	82,3
5038+5259	61,8	5,1	77,7	7,5	86,9	2,9	104,0	5,2	82,3
4785+5106	52,3	6,7	80,9	11,1	84,0	3,2	92,5	7,1	82,4
4889	54,0	18,1	90,8	7,4	83,3	4,2	82,7	5,5	83,0
5143+5259	74,2	9,5	79,6	3,8	87,7	4,7	96,9	3,3	83,6
5101	54,6	6,6	83,7	6,6	100,7	2,5	84,6	8,5	84,1
4785	60,7	11,1	81,2	7,8	88,3	11,1	91,4	6,5	84,8
5259	69,2	10,8	79,4	6,5	90,3	4,2	96,0	7,4	84,8
5038	80,3	19,1	86,3	9,6	84,1	8,9	93,4	2,8	85,2
5144+4889	58,1	5,4	87,0	5,4	86,2	5,4	89,7	11,8	86,6
5038+4935	63,9	4,6	87,7	5,2	85,8	8,6	103,4	7,3	86,8
5038+5101	63,8	8,8	87,9	2,9	86,0	4,4	89,5	8,7	86,9
4785+5143	72,1	11,6	92,3	4,5	82,8	5,1	92,5	5,6	87,6
5038+5106	65,3	4,0	90,7	8,2	84,9	5,2	94,6	7,6	87,8
5101+5106	59,3	4,2	84,6	4,6	102,8	5,5	91,2	6,9	87,9
5143	69,0	13,9	92,7	7,7	84,0	3,8	93,8	3,3	88,4
5101+5259	61,6	12,1	85,0	5,1	99,5	8,8	92,2	4,0	88,6
4935+5259	74,9	10,5	88,4	6,7	89,2	0,7	102,0	2,9	88,8
5038+5144	73,6	9,7	85,1	7,1	93,3	5,2	97,0	6,5	89,2
4785+5101	64,7	13,8	87,8	7,9	91,1	5,1	92,3	7,3	89,5
4785+5144	69,5	6,9	87,1	2,0	93,8	7,2	97,8	3,9	90,5

	MDA-MB-175		MCF7 +1 nM de Heregulina beta		H1437 + 1 nM de Heregulina beta		A431NS + 1 µg/ml de Sym004*		Mediana
	%MAC	SD	%MAC	SD	%MAC	SD	%MAC	SD	%MAC
5106	47,6	10,7	84,3	14,0	97,8	4,9	98,1	3,4	91,0
5106+5143	70,8	5,2	91,0	5,6	91,7	6,4	94,5	3,7	91,4
5101+5143	66,2	10,0	93,0	7,6	93,1	6,3	89,9	5,4	91,4
4785+4935	72,2	6,8	90,6	3,8	93,2	6,8	102,7	5,5	91,9
5106+5259	63,1	4,0	87,9	2,4	98,6	4,4	99,2	3,4	93,2
4935+5106	65,6	5,6	95,3	14,7	92,1	6,3	99,7	11,1	93,7
5144+5143	80,0	11,1	91,8	5,0	96,2	10,5	98,9	7,5	94,0
4935	78,1	15,0	98,6	12,8	91,1	6,7	99,6	15,0	94,8
4935+5143	87,3	6,4	101,6	11,3	91,6	9,7	99,6	9,4	95,6
5144+5106	62,2	10,4	92,0	3,9	100,1	7,6	101,3	5,4	96,0
4935+5101	72,8	14,8	96,3	5,7	96,2	7,1	100,6	11,3	96,3
5144	72,6	16,4	94,8	11,5	99,2	8,9	99,0	10,9	96,9
5144+5101	62,6	9,9	98,6	1,7	105,6	2,3	97,8	5,1	98,2
5144+5259	79,0	2,0	98,0	7,1	98,8	3,5	102,4	5,4	98,4
4935+5144	81,4	4,8	104,6	16,3	99,5	5,4	99,5	8,7	99,5

*Sym004 es una mezcla de dos anticuerpos recombinantes anti-EGFR dirigidos contra epítomos de EGFR no solapantes; véanse el documento WO 2008/104183 y Pedersen et al. (2010) Cancer Res. 70(2):588-597.

5 Las Figuras 12-15 muestran la actividad metabólica de mezclas seleccionadas de anticuerpos anti-HER3 (las mezclas destacadas en negrita en la tabla anterior) en las cuatro estirpes celulares diferentes. La Figura 12 muestra la actividad metabólica en la estirpe celular MDA-MB-175, la Figura 13 muestra la actividad en la estirpe celular A431NS en presencia de 1 µg/ml de Sym004, la Figura 14 muestra la actividad en la estirpe celular MCF7 en presencia de nM de heregulina beta, y la Figura 15 muestra la actividad en la estirpe celular H1437 en presencia de 1 nM de heregulina beta.

Ejemplo 5: Caracterización funcional de mezclas de tres anticuerpos anti-HER3

10 Este ejemplo describe el ensayo *in vitro* de mezclas de tres anticuerpos con epítomos no solapantes y combinaciones de agrupamientos únicas entre anticuerpos seleccionados anti-HER3 de la invención con unión confirmada a HER3 humano. Las mezclas de anticuerpos se evaluaron para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de cuatro estirpes de células cancerosas diferentes: MDA-MB-175, MCF7 (+ 1 nM heregulina beta), H1437 ((+ 1 nM heregulina beta) y A431NS (1 µg/ml de mezcla 992+1024 anti-EGFR).

Métodos

15 Los anticuerpos 4785, 4889, 5038, 5082, 5106, 5143 y 5259, cada uno de los cuales tenía confirmada la unión al receptor de HER3 humano, se ensayaron en mezclas de tres anticuerpos a fin de identificar mezclas de anticuerpos con eficacia óptima. Los anticuerpos seleccionados y las mezclas de anticuerpos se ensayaron para determinar la capacidad para inhibir el crecimiento y proliferación de las estirpes de células cancerosas MDA-MB-175, MCF7 (+ 1 nM heregulina beta), H1437 (+ 1 nM heregulina beta) y A431NS (1 µg/ml de mezcla 992+1024 anti-EGFR) usando el ensayo de viabilidad de WST-1 como se describe en el Ejemplo 4.

20

Resultados

Se encontró que todas las mezclas ensayadas de tres anticuerpos inhiben las cuatro estirpes celulares, aunque con diferente potencia.

Las Figuras 16-19 muestran la actividad metabólica de diferentes mezclas de tres anticuerpos anti-HER3 en las cuatro estirpes de células cancerosas. La Figura 16 muestra la actividad metabólica en la estirpe celular MDA-MB-175, la Figura 17 muestra la actividad en la estirpe celular A431NS en presencia de 1 µg/ml de Sym004, la Figura 18 muestra la actividad en la estirpe celular MCF7 en presencia de nM de heregulina beta, y la Figura 19 muestra la actividad en la estirpe celular H1437 en presencia de 1 nM de heregulina beta.

Ejemplo 6: Inhibición sinérgica del crecimiento del cáncer mediante 2 mezclas anti-HER3

Este ejemplo demuestra que ciertas mezclas de anticuerpos anti-HER3 inhiben sinérgicamente el crecimiento de células cancerosas.

Métodos

Los anticuerpos 5038, 5082 y 5144, cada uno de los cuales había confirmado la unión al receptor de HER3 humano, se ensayaron como mezclas de dos anticuerpos, 5038+5082 y 5082+5144, comparando en cada caso la mezcla de los dos anticuerpos con los dos anticuerpos individuales en la mezcla, a fin de investigar la inhibición sinérgica del crecimiento celular. Los anticuerpos seleccionados y mezclas de anticuerpos se ensayaron para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento y proliferación de la estirpe de células cancerosas MDA-MB-175 usando el ensayo de viabilidad de WST-1 como se describe en el Ejemplo 4.

Resultados

Los resultados muestran que una mezcla de anticuerpos 5038+5082 o 5082+5144 inhibe sinérgicamente el crecimiento de la estirpe de células cancerosas MDA-MB-175 (Figuras 20 y 21).

Ejemplo 7: Comparación de mezclas de anticuerpos anti-HER3 y anticuerpos monoclonales de referencia

Este ejemplo describe una comparación *in vitro* de una mezcla de anticuerpos anti-HER3 (5038+5082) y análogos de los anticuerpos de referencia pertuzumab y MM-121 en las estirpes celulares MDA-MB-175 y MCF-7. Pertuzumab es un anticuerpo anti-HER2 que se une al brazo de dimerización de HER2 y bloquea la heterodimerización de HER2/HER3. El análogo de pertuzumab tiene las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y de la cadena pesada de pertuzumab como se describe en los documentos WO 2006/033700 y US 2006/0121044 A1. MM-121 es un anticuerpo anti-HER3 que bloquea la unión de heregulina a, y por tanto la activación de, HER3 (véanse el documento WO 2010/019952 y Schoeberl et al., Cancer Res. 70(6):2485-94, Marzo 2010).

Métodos

Métodos

Se generaron curvas de respuesta frente a la dosis como se describe en el Ejemplo 4. Se generaron análogos del anticuerpo monoclonal de referencia anti-HER3 MM-121 (Merrimack; secuencia descrita en el documento WO 2008/100624) y el anticuerpo de referencia anti-HER2 pertuzumab (también conocido como Omnitarg™, 2C4 y R-1273; secuencia descrita en el documento US 2006/121044 A1) sintetizando la cadena ligera lambda completa (MM-121) o la cadena ligera kappa (pertuzumab) de los anticuerpos respectivos sin el péptido señal, añadiendo sitios de restricción de NheI y NotI de flanqueo, y clonando en un vector de expresión para la expresión transitoria en células HEK 293. Las regiones VH de cadena pesada de los anticuerpos respectivos se sintetizaron sin el péptido señal, tras lo cual se añadieron los sitios Ascl y XhoI, y las secuencias resultantes se clonaron en los mismos vectores de expresión usados para la expresión de la cadena ligera, que también contenían secuencias que codifican los tres dominios constantes CH1, CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG. Los vectores incluyeron un par de promotores del CMV, en una orientación de cabeza a cabeza, para la expresión de las dos cadenas de cada anticuerpo.

Resultados

Los resultados muestran que la mezcla de anticuerpos 5038+5082 es superior al anticuerpo de referencia MM-121 inhibiendo el crecimiento de las dos estirpes de células cancerosas MDA-MB-175 y MCF7. Usando estas estirpes celulares, no se encontró ninguna superioridad aparente de 5038+5082 con respecto a pertuzumab. En la Figura 22 se muestra la actividad metabólica en células MDA-MB-175, y en la Figura 23 se muestra la actividad metabólica en células MCF7 en presencia de 1 nM de heregulina beta.

Ejemplo 8: La mezcla de anticuerpos anti-HER3 induce degradación de HER3

Este ejemplo demuestra que una mezcla de dos anticuerpos anti-HER3 es capaz de inducir una degradación más eficaz de HER3 en comparación con los anticuerpos anti-HER3 individuales. En este estudio también se evaluó un análogo de pertuzumab.

Métodos

A fin de investigar los niveles de HER3 en estirpes celulares tratadas con anticuerpos anti-HER3, se llevaron a cabo análisis de transferencia western en lisados de células completas de células OVCAR-8 tratadas con anticuerpos en

diversos momentos. Las células se hicieron crecer en matraces de cultivo T-75, y a una confluencia de 80%, el medio de cultivo se eliminó, las células se lavaron en 1xPBS y se trataron con 20 µg/ml de los anticuerpos diluidos en 5 ml de medio que contiene 0,5% de FBS. Las células se trataron durante 1, 2, 4, 16 o 48 horas, tras lo cual se prepararon lisados de células completas usando el amortiguador de RIPA estándar. Se determinó en cada muestra la concentración total de proteína, y se analizaron 10 µg de proteína mediante transferencia western usando anticuerpo primario contra HER3.

Resultados

Los resultados de la investigación de los niveles de HER3 (Figura 24) demostraron que tanto los anticuerpos individuales como la mezcla indujeron degradación rápida de HER3. Sin embargo, la mezcla anti-HER3 indujo un mayor nivel de degradación de HER3 en comparación con los anticuerpos individuales. El análogo de pertuzumab no fue capaz de inducir degradación de HER3, que era lo que se esperaba, dado que se une a HER2 y no a HER3.

Ejemplo 9: La mezcla de anticuerpos anti-HER3 inhibe la señalización de HER3

Este ejemplo demuestra que una mezcla de dos anticuerpos anti-HER3 es capaz de inducir una supresión más eficaz de la fosforilación y señalización aguas abajo de HER3 que los anticuerpos individuales.

Métodos

A fin de investigar los niveles de fosforilación y señalización aguas abajo de HER3, se trataron estirpes celulares con anticuerpos anti-HER3 durante diversos momentos, y se llevaron a cabo análisis de transferencia western sobre lisados de células completas. Se hicieron crecer células MDA-MB-175 en matraces de cultivo T-75, y a una confluencia de 80%, el medio de cultivo se eliminó, tras lo cual las células se lavaron en 1xPBS y se trataron con 10 µg/ml de los anticuerpos diluidos en 5 ml de medio que contiene 0,5% de FBS. Las células se trataron durante 2, 4, 16 o 48 horas, después de lo cual se prepararon lisados de células completas usando amortiguador de RIPA estándar. La concentración de proteína total se determinó en cada muestra, y se analizaron 10 µg de proteína mediante transferencia western usando anticuerpos primarios contra pHER3, pAKT(Ser465), AKT y actina, respectivamente.

Resultados

Los resultados de la investigación de la señalización de HER3 (Figura 25) demostraron que tanto los anticuerpos individuales como la mezcla indujeron inhibición rápida de la fosforilación de HER3 y AKT. Sin embargo, la mezcla anti-HER3 fue superior a los anticuerpos individuales inhibiendo la fosforilación de HER3 y AKT.

Ejemplo 10: Eficacia *in vivo* de mezclas anti-HER3

Para evaluar la eficacia *in vivo* de los anticuerpos monoclonales anti-HER3 5038 y 5082 y la mezcla de 5038+5082, los compuestos se estudiaron en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón A549.

Métodos

Se inocularon subcutáneamente 2×10^6 células A549 en el flanco derecho de ratones atímicos hembra de ocho a diez semanas. Los tumores se midieron dos veces por semana con calibres, y el volumen tumoral, en mm^3 , se calculó según la fórmula: $(\text{anchura})^2 \times \text{longitud} \times 0,5$. A un tamaño tumoral promedio de 115 mm^3 , los ratones se distribuyeron al azar, y se inició el tratamiento. Los ratones se trataron con inyecciones intraperitoneales dos veces por semana de 50 mg/kg de 5038, 5082 o 5038+5082, durante cinco semanas (10 inyecciones en total), seguido de un período de observación. El experimento incluyó el anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab (como un control de isotipo) y un control de vehículo, que se dosificaron cada uno y administraron siguiendo el mismo programa que para los anticuerpos anti-HER3.

Resultados

Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 26, en la que se observa que, en ratones tratados con 5038 o la combinación de 5038+5082, el crecimiento tumoral se controló en respuesta al tratamiento desde el día 26 (comienzo del tratamiento) hasta el día 37. Tras este punto, los tumores en los dos grupos comenzaron a crecer, aunque el crecimiento fue más lento en comparación con los tumores en los grupos de cetuximab o de control de vehículo. Aunque los resultados tras este punto no son estadísticamente significativos, hay una clara tendencia de que los tumores en los grupos tratados con 5038 y 5038+5082 crecen de forma más lenta en comparación con los tumores en el grupo de control así como en los grupos que reciben cetuximab o 5082. Los ratones tratados con 5082 solo o con cetuximab no respondieron al tratamiento, y mostraron una cinética del crecimiento tumoral similar al grupo del control de vehículo.

En resumen, los resultados sugieren que 5038 y la combinación de 5038+5082 fueron mejores controlando el crecimiento de los xenoinjertos de tumor A549 en comparación con el tratamiento con 5082 solo, cetuximab, o el control de vehículo.

Ejemplo 11: Cartografiado de los anticuerpos anti-HER3 contra los dominios de HER3 individuales

Este ejemplo demuestra que el panel generado de anticuerpos anti-HER3 con actividad funcional está dirigido contra el dominio I o dominio II del dominio extracelular (ECD) de HER3, como se muestra por el perfil de unión a constructos de receptores quiméricos humanos/de ratón.

5 Métodos

Debido a que el panel de anticuerpos anti-HER3 se provocó en ratones, no se espera que los anticuerpos reconozcan epítomos presentes en HER3 murino, debido al concepto de "autotolerancia". En consecuencia, los constructos de receptores quiméricos en los que las secuencias humanas que codifican dominios individuales se sustituyen por secuencias murinas se pueden emplear para fines de cartografiado epitópico, puesto que no se espera que los anticuerpos se unan a la secuencia murina insertada en el constructo de HER3 humano. Las secuencias de ARNm de HER3 humano y murino (número de acceso M29366 y NM_010153.1, respectivamente) se descargaron de NCBI, y los dominios I-IV extracelulares se asignaron como se describe por Kani et al. (J. Biol. Chem. (2005) 280:8238-8247). Las variantes de intercambio de dominios quiméricos humanos/murinos, en los que cada uno de los cuatro dominios de HER3 extracelulares humanos se sustituyeron por la secuencia de ADN murino respectiva, se proporcionaron con una etiqueta de histidina N-terminal, se genosintetizaron y se expresaron transitoriamente en células Hek 293. Como controles positivo y negativo, respectivamente, se usaron un constructo de ECD completamente humano y uno murino. Los sobrenadantes procedentes de los constructos de los receptores expresados transitoriamente se purificaron mediante cromatografía de afinidad de la etiqueta de histidina usando columnas de níquel NTA, y las proteínas purificadas se revistieron en placas de ELISA a 1 µg/ml en amortiguador de carbonato toda la noche. Al día siguiente, los pocillos se bloquearon con 1% de BSA/PBS-T, y se añadieron las titulaciones de anticuerpos diluidos en amortiguador de bloqueo. Finalmente, los pocillos se lavaron, y el ELISA se desarrolló por adición de FC de ratón anti-IgG humana conjugado a HRP, seguido del lavado y adición del sustrato TMB.

Resultados

Se encontró que los anticuerpos 5101 y 5106 tienen tolerancia discontinua en el transcurso de la inmunización, y reaccionaron contra HER3 murino (Figuras 27-32). Pero debido a que 5101 y 5106 tienen valores de densidad óptica (OD) de ELISA en el constructo de HER3 de DI murino-DII-IV humano (es decir, un constructo con un dominio I murino y los dominios II-IV humanos) menores que en otros constructos quiméricos en los que el dominio I tiene una secuencia humana, se puede concluir que estos dos anticuerpos se unen a epítomos situados en el dominio I (DI) de HER3 humano. Los anticuerpos 5144 y 5259 no reconocieron DI murino, y se unieron débilmente a las variantes de intercambio de DII murino. Estos dos anticuerpos están en consecuencia dirigidos contra epítomos que se solapan con el dominio I y II en HER3 humano. El resto de los anticuerpos no reconocen la variante de intercambio de DI murino, pero sí se unieron a las otras variantes, y por lo tanto están dirigidos contra epítomos en el dominio I de HER3 humano.

En las Figuras 27-32 se muestra el cartografiado de dominios de los anticuerpos anti-HER3, que es una titulación de los anticuerpos anti-HER3 y controles negativos contra antígenos de HER3 revestidos. El anticuerpo unido se detectó con un anticuerpo anti-Fc humano. Se observa un fondo elevado contra Fc anti-HER3 humano, debido a reactividad cruzada entre el conjugado anti-Fc y la proteína de fusión de HER3 Fc. Sin embargo, los controles negativos demuestran claramente la diferencia entre la unión específica y la no específica. La Tabla 7 a continuación proporciona un resumen de los dominios de HER3 seleccionados como diana por los diferentes anticuerpos anti-HER3.

Tabla 7: Dominios seleccionados como dianas por diferentes anticuerpos anti-HER3

mAb	Dominio de HER3
4785	DI
4889	DI
4935	DI
5038	DI
5082	DI
5101*	DI
5106*	DI
5143	DI

mAb	Dominio de HER3
5144	DI/DII
5259	DI/DII
*Anticuerpos que reaccionan de forma cruzada entre ECD de HER3 humano y de ratón	

Ejemplo 12: Agrupamiento epitópico de anticuerpos anti-HER3 mediante resonancia de plasmones superficiales

5 Este ejemplo demuestra cómo pares de anticuerpos anti-HER3 con actividad funcional se dirigen contra al menos cinco agrupamientos epitópicos no solapantes en el dominio I o II del ECD de HER3.

Métodos

10 Se llevó a cabo el análisis de competición cruzada de anticuerpos evaluando pares de anticuerpos con análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento Biacore 2000 (GE Healthcare, Dinamarca). Un chip sensor CM5 (GE Healthcare, Dinamarca) se conjugó con 10.000 unidades de resonancia (RU) de un anticuerpo anti-tetrahistidina (Qiagen, Alemania), según las instrucciones del fabricante. La proteína de fusión HER3-Fc etiquetada con histidina (R&D Systems) se diluyó en amortiguador de HBS y se capturó en una superficie anti-histidina a un caudal de 5 µl/minuto. Las combinaciones de anticuerpos se evaluaron en experimentos de unión competitiva a una concentración saturante de 40 µg/ml registrando los niveles de respuesta máxima con y sin competición. La superficie del chip se regeneró mediante inyección de 10 mM de glicina-HCl, pH 2.

15 Resultados

Se encontró que los 10 anticuerpos anti-HER3 se agrupan frente a 5 agrupamientos epitópicos no solapantes diferentes (Figuras 33+34). El agrupamiento epitópico 1 contenía los tres anticuerpos 4785, 4935 y 5143. El agrupamiento epitópico II contenía los anticuerpos 5082 y 4889, de los cuales se encontró que mAb 5082 también compite de forma cruzada con mAb 5143 del agrupamiento epitópico 1. El agrupamiento epitópico III fue único, y contenía solamente mAb 5038. El agrupamiento epitópico IV contenía los mAbs 5101 y 5106, que también reaccionaron de forma cruzada con la proteína HER3 de ratón (Ejemplo 11). Finalmente, el agrupamiento epitópico V contenía los anticuerpos 5144 y 5259, que se encontró que se unen a epítomos similares presentes tanto en DI como DII (Ejemplo 11).

25 La Figura 33 muestra una tabla con los resultados del agrupamiento epitópico mediante análisis de competición cruzada de anticuerpos. El análisis se llevó a cabo saturando en primer lugar el antígeno HER3 con los anticuerpos enumerados en la parte superior, seguido de la inyección de los anticuerpos enumerados en la izquierda. Los números en las células se refieren al porcentaje de competición, calculado como:

$$(1 - (\text{respuesta máxima con competición} / \text{respuesta máxima sin competición})) \times 100$$

30 Las células recuadradas representan pares de anticuerpos que se inhiben entre sí en al menos 50%. Los anticuerpos se asignan en agrupamientos epitópicos según el perfil de competición; véase la Figura 34, que proporciona una ilustración gráfica de la relación entre los agrupamientos epitópicos asignados, en los que los círculos solapantes representan anticuerpos con epítomos solapantes.

Ejemplo 13: Eficacia *in vivo* de mezclas anti-HER3

35 Para evaluar la eficacia *in vivo* de los anticuerpos monoclonales 5038 y 5082 anti-HER3 y la mezcla de 5038+5082, se estudiaron los compuestos en el modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático BxPC3.

Métodos

40 Se inocularon subcutáneamente 5×10^6 células BxPC3 en el flanco izquierdo de ratones atímicos hembra de ocho a diez semanas. Los tumores se midieron dos veces por semana con calibres, y el volumen tumoral, en mm^3 , se calculó según la fórmula: $(\text{anchura})^2 \times \text{longitud} \times 0,5$. A un tamaño tumoral promedio de 165 mm^3 , los ratones se distribuyeron al azar, y se inició el tratamiento. Los ratones se trataron con inyecciones intraperitoneales dos veces por semana de 50 mg/kg de 5038, 5082, o una mezcla de 5038+5082, durante 3 semanas (6 inyecciones en total), seguido de un período de observación. El experimento incluyó un control de vehículo, que se dosificó y administró siguiendo el mismo calendario como se describe para los anticuerpos anti-HER3 anteriores.

Resultados

45 En los ratones tratados con 5038 o la combinación de 5038+5082, el crecimiento tumoral se inhibió significativamente mejor en comparación con los ratones en el grupo del control de vehículo (Figura 35). En los

5 ratones tratados con 5038+5082, se observó una diferencia significativa en comparación con el grupo del control de vehículo tan temprano como cinco días después del primer tratamiento, y duró a lo largo de todo el período de estudio. Los ratones tratados con 5038 fueron significativamente mejores a la hora de controlar el crecimiento tumoral en comparación con los animales tratados con el control de vehículo a partir del día 57, y, con la excepción de un día (día 64), esto se observó a lo largo de todo el período de estudio.

La inhibición eficaz del crecimiento tumoral por 5038 y la combinación de 5038+5082 también se pudo observar atendiendo a la supervivencia. Ambos de estos tratamientos fueron significativamente mejores en comparación con el grupo del control de vehículo según se calculó mediante una prueba de logaritmo de rangos (Mantel Cox) con un valor de p de 0,003 para 5038 y de 0,001 para 5038+5082 (Figura 36).

10 En resumen, 5038 y la combinación de 5038+5082 fueron significativamente mejores inhibiendo el crecimiento tumoral y mejoran la supervivencia de los animales con xenoinjertos de tumores BxPC3, en comparación con el control de vehículo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Symphogen A/S

15 <120> Anticuerpos anti-HER3 y combinaciones

<130> P142PC00

<160> 83

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

20 <211> 354

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

25 <223> Ab 4785 VH ADN

<400> 1

gagggtccaac tgcaacagtc tggaccagaa ctggtgatgc ctggggcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg cttctggcta cagcttcaca agctactatg tacactgggt gaagcagagg	120
cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatcctg gaagtgggtca tactaagtac	180
aatgagaagt tcaaggacaa ggccacactg acggcagaca catcctccag cactgcctac	240
atgcaactca gcagcctaac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaccccc	300
tactatagta actacgccga tgtctggggc acagggacca cggtcaccgt ctcg	354

<210> 2

<211> 118

30 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 4785 VH

35 <400> 2

ES 2 692 379 T3

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

<210> 3

5 <211> 667

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

10 <223> Ab 4785 LC ADN

<400> 3

gacattgtga tgactcagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact 60
 atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120
 tggtagcagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccacaagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagagtga ttatagttat 300
 ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 480
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
 ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660
 taataag 667

<210> 4

ES 2 692 379 T3

<211> 220

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

5 <221> característica diversa

<223> Ab 4785 LC

<400> 4

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 5

10 <211> 351

ES 2 692 379 T3

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

5 <223> Ab 4889 VH ADN

<400> 5

```

gaagtgcagc ttgtggagtc aggacctggc ctctgtaaac cttctcagtc tctgtctctc      60
acctgctctg tcaactggcta ctccatcacc agtgcttatt actggaactg gatccggcag      120
tttccaggaa acaaaactgga atggatgggc tacgtaagct acgatggtag caatacctac      180
aaccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc      240
ctgaagttga tttctctgac tactgaggac accgccacat attactgtgc aagagagggg      300
gactatgggtt attctgacta ttggggccaa ggcaccactc tcacagtctc g                351
    
```

<210> 6

<211> 117

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 4889 VH

15 <400> 6

```

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

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

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

Met Gly Tyr Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50          55          60

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser
115
    
```

<210> 7

ES 2 692 379 T3

<211> 649

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

5 <221> característica diversa

<223> Ab 4889 LC ADN

<400> 7

```

gatattgtga tgacgcagtc tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc      60
gtcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca      120
gatggaacta ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacattcagg agtcccatca      180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggaccaa      240
gaagatattg ccacttactt ttgccaacag agtaatacgc ttccgtggac gttcggtgga      300
ggcaccaagc tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccgcc      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaa gactactcga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaataag      649

```

<210> 8

10 <211> 214

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

15 <223> Ab 4889 LC

<400> 8

```

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Asp Gln

```


ES 2 692 379 T3

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 4935 VH

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Val Arg Arg Tyr Gly Tyr Asp Gly Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

5

<210> 11

<211> 661

<212> ADN

<213> Mus musculus

10

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 4935 LC ADN

<400> 11

gatatccaga tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atattctgca gagccagtga aagtgtgat agttatggca atacttttat gcactggtac 120

cagcagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcatctatc gtgcatcaa cctagaatct 180

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240

15

ES 2 692 379 T3

cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtgg 300
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc 360
 atcttcccg ccatctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttaataa 660
 g 661

<210> 12

<211> 218

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 4935 LC

<400> 12

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

10

ES 2 692 379 T3

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 13

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5038 VH ADN

<400> 13

gaggtgaagc tggttgagtc aggacctggc ctcgtagaac cttctcagtc tctgtctctc 60
acctgctctg tcaactggcta ctccatcacc agtggttttt actggacctg gatccggcag 120
tttccaggca acaaattgga atggatgggc ttcataagct acgatggtag caataactac 180
aaccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc 240
ctgaagtga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aagaggcgga 300

10 ggctactatg gtaacctctt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcg 357

<210> 14

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5038 VH

<400> 14

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly

20

ES 2 692 379 T3

20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
115

<210> 15

<211> 649

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5038 LC ADN

<400> 15

gatattgtga tgactcaaac tacatcctcc ctgtccgcct ctctgggaga cagagtcacc	60
atcagttgca ggccaagtca ggacattagc aattatgtaa actggtttca gcagaaacca	120
ggtggaactg ttaagctcct gatcttccac acatcaagat tacactcagg agtcccatca	180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcac cctggaacag	240
gaagatattg ccatttactt ttgccaacag ggtattacgc ttccgtggac gttcgggtggc	300
ggcaccaagc tggaataaaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
10 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaataag	649

<210> 16

<211> 214

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <220>

ES 2 692 379 T3

<221> característica diversa

<223> Ab 5038 LC

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

5

210

<210> 17

<211> 351

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

ES 2 692 379 T3

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5082 VH ADN

<400> 17

```

gaggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc      60
acctgctctg tcaccggcta ctccatcacc agtgcttatt actggaactg gatccggcag      120
tttccaggaa acaaagtgga atggatgggc tacataggct acgatggtcg taatacctac      180
aaccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc      240
ctgaaattga attctctgac tactgaggac acagccacat attattgttc aagagagggg      300
5 gactacggtt actctgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc g              351

```

<210> 18

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

10 <220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5082 VH

<400> 18

```

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Gly Tyr Asp Gly Arg Asn Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50                               55                               60

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

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

```

15

```

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

Thr Leu Thr Val Ser
115

```

<210> 19

<211> 649

<212> ADN

ES 2 692 379 T3

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5082 LC ADN

5 <400> 19

```

gatattgtga tgacgcaagc tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc      60
gtcagttgca gggcaagtca ggacattaac aattatttaa attggtatca gcagaagcca      120
gatggaactg ttaaaactcct gatctactac acatcaagat tacagtcagg agtcccatca      180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaatagat tattctctca ccattagcaa cctggagcag      240
gaagattttg tcacttactt ttgccaacag agtgaaacgc ttccgtggac gttcggtgga      300
ggcaccaagc tggagctgaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgccca      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaataag                    649

```

<210> 20

<211> 214

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5082 LC

<400> 20

```

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

```

15 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

ES 2 692 379 T3

tcagacaatg taaagggccg attcaccatc tccagggaca atgccagaa caatctgtat 240
 ttgcaaatga gccatctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagaggata 300
 ttggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcg 339

<210> 22

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5101 VH

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

10 Ser

<210> 23

<211> 649

<212> ADN

<213> Mus musculus

15 <220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5101 LC ADN

<400> 23

ES 2 692 379 T3

caaattgttc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
 atcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtttca gcagagacca 120
 gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggttc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
 gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggagctgaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaagc cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaataag 649

<210> 24

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5101 LC

<400> 24

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

10

ES 2 692 379 T3

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 25

<211> 339

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5106 VH ADN

<400> 25

gaagtgaagc tggttgagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagagtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttgcca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccggaaaaga ggctggaatg ggtcgcgaacc attagtgatg gtggtagtca tctttactat 180

ccggacaatg taaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa taacctgtac 240

ctgcagatga gccatctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagaggtatt 300

10 ttggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcg 339

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5106 VH

<400> 26

ES 2 692 379 T3

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

Ser

<210> 27

<211> 649

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5106 LC ADN

<400> 27

gatattgtga tgactcaagc tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc	60
atcagttgca gtgcaagtca ggacattaac aattatttaa actggtatca gcagaaacca	120
gatggaacta ttaaactcct gatctattac acatcaagtt taaactcagg agtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggtgc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct	240
gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtagga ttccgtacac gttcggaggg	300
gggaccaagc tggaaataaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
10 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttaataag	649

<210> 28

<211> 214

ES 2 692 379 T3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

5 <223> Ab 5106 LC

<400> 28

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

10 <210> 29

<211> 354

<212> ADN

ES 2 692 379 T3

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5143 VH ADN

5 <400> 29

```
caggccaac tgcaacagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata      60
tcctgcaagg cttctggcta cagcttcaca agctactata tacattgggt gaagcagagg      120
cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatcctg gaagtgggtca tactaagtac      180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg acggcagaca catcctccag cactgcctac      240
atgcagctca gcagcctaac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacctccc      300
tactatagta actacgccga tgtctggggc acagggacca cggtcaccgt ctcg          354
```

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5143 VH

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser
115
```

<210> 31

<211> 667

ES 2 692 379 T3

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

5 <223> Ab 5143 LC ADN

<400> 31

gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact	60
atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacatgacc	120
tggtatcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg	180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacgggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc	240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat	300
ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gagctgaaac gaactgtggc tgcacatct	360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc	420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc	480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc	540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaaagt ctacgcctgc	600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt	660
taataag	667

<210> 32

<211> 220

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5143 LC

15 <400> 32

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly

ES 2 692 379 T3

cagggtgcagc ttaaggagtc aggacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc 60
 acatgcactg tctctgggtt ctcatatcc agatatagtg tacactgggt tcgccagcct 120
 ccaggaagg gtctggagtg gctgggaatg atatggggtg gtggaagcac agactataat 180
 tcagctctca aatccagact gaacatcaac aaggacaact ccaagagcca agtttttttt 240
 aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgtcag aaaagggatt 300
 acgacgacgg ggtttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc g 351

<210> 34

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5144 VH

<400> 34

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

Thr Leu Thr Val Ser
115

10

<210> 35

<211> 646

<212> ADN

<213> Mus musculus

15

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5144 LC ADN

ES 2 692 379 T3

<400> 35

```

cacattgtgc tgaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc      60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgtact ggtaccaaca gaagccacga      120
tcctccccc gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc      180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgac      240
gatgtgcca cttattactg ccagcagttg agtagttacc caccacggt cggagggggg      300
accaagctgg agctgaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct      360
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc      420
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag      480
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg      540
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg      600
agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aataag                      646

```

<210> 36

<211> 213

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5144 LC

10 <400> 36

```

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

```

ES 2 692 379 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 37

<211> 351

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5259 VH ADN

<400> 37

gaggtgcagc ttgtggagtc aggacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc 60

acatgcactg tctctgggtt ct cattatcc agatatacta tccactgggt tgc ccagcct 120

ccaggaagg gtctggagtg gctgggaatg atatgggtg gtggaagcac agactataat 180

tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca acttttctta 240

aaaatgaaca gtctgcagac tgatgacaca gccatttact actgtgccag aaaagggatt 300

10 acgacgacgg ggtttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc g 351

<210> 38

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <220>

ES 2 692 379 T3

<221> característica diversa

<223> Ab 5259 VH

<400> 38

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

5 <210> 39

<211> 646

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

10 <221> característica diversa

<223> Ab 5259 LC ADN

<400> 39

aacattgtgc tgacacagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
 atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgttct ggtaccagca gaagccagga 120
 tcctcccca gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgaa 240
 gatgctgcca cttattactg ccagcagttg aatagttatc caccacggtt cggagggggg 300
 accaagctgg aaataaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 360

ES 2 692 379 T3

gatgagcagt tgaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
 agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 600
 agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aataag 646

<210> 40

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> Ab 5259 LC

<400> 40

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

10

ES 2 692 379 T3

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 41

<211> 320

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> característica diversa

<223> ADN kappa de Ig humana

<220>

10 <221> exón

<222> (3)..(320)

<400> 41

ga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag 47
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc 95
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa 143
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc 191
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag 239
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75

aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg 287
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 80 85 90 95

ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 320
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 42

15 <211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 692 379 T3

<220>

<221> Región constante kappa de Ig humana

<222> (1)..(106)

<400> 42

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

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

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

5 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 43

<211> 1602

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <220>

<221> característica diversa

<223> Secuencia genómica del dominio constante de IGHG1 humana

<220>

<221> exón

15 <222> (1)..(298)

<220>

<221> exón

<222> (690)..(734)

<220>

20 <221> exón

<222> (853)..(1182)

<220>

<221> exón

<222> (1280)..(1602)

ES 2 692 379 T3

<400> 43

agt gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser 1 5 10 15	48
aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp 20 25 30	96
tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr 35 40 45	144
agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr 50 55 60	192
tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln 65 70 75 80	240
acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp 85 90 95	288
aag aga gtt g gtgagaggcc agcacaggga gggagggtgt ctgctggaag Lys Arg Val	338
ccaggctcag cgctcctgcc tggacgcatc cgggctatgc agtcccagtc cagggcagca	398
aggcaggccc cgtctgcctc ttcacccgga ggcctctgcc cgccccactc atgctcaggg	458
agagggtcct ctggcttttt ccccaggctc tgggcaggca caggctaggt gccctaacc	518
cagggcctgc acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc catatccggg	578
aggaccctgc cctgaccta agcccccccc aaaggccaaa ctctccactc cctcagctcg	638
gacaccttct ctctcccag attccagtaa ctoccaatct tctctctgca g ag ccc Glu Pro 100	694
aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca g gtaagccagc Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro 105 110	744
ccaggcctcg cctccagct caaggcggga caggtgccct agagtagcct gcatccaggg	804
acaggcccca gcgggtgct gacacgtcca cctccatctc ttcctcag ca cct gaa Ala Pro Glu 115	860
ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp 120 125 130	908
acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp 135 140 145	956
gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc	1004

ES 2 692 379 T3

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 150 155 160 165

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac 1052
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 170 175 180

agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg 1100
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 185 190 195

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca 1148
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 200 205 210

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa g gtgggacccg 1192
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 215 220

tgggggtgcca gggccacatg gacagaggcc ggctcggccc accctctgcc ctgagagtga 1252

ccgctgtacc aacctctgtc cctacag gg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac 1305
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 225 230

acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg 1353
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 235 240 245

acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg 1401
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 250 255 260 265

gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg 1449
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 270 275 280

ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac 1497
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 285 290 295

aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat 1545
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 300 305 310

gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg 1593
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 315 320 325

ggt aaa tga 1602
 Gly Lys
 330

<210> 44

<211> 331

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> característica diversa

<223> Región constante de IGHG1 humana

<400> 44

ES 2 692 379 T3

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 20 25 30

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 35 40 45

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

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 65 70 75 80

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 85 90 95

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 100 105 110

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 130 135 140

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 145 150 155 160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 165 170 175

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 180 185 190

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 195 200 205

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 210 215 220

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 225 230 235 240

ES 2 692 379 T3

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 245 250 255

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 260 265 270

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 275 280 285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 290 295 300

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 305 310 315 320

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> 4785/5143 HCDR1

<400> 45

10 Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr
 1 5

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <220>

<221> característica diversa

<223> 4785/5143 HCDR2

<400> 46

Ile Tyr Pro Gly Ser Gly His Thr
 1 5

20 <210> 47

<211> 14

<212> **PRT**

<213> Mus musculus

<220>

25 <221> característica diversa

<223> 4785/5143 HCDR3
 <400> 47
 Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr Ala Asp Val Trp
 1 5 10
 <210> 48
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 10 <223> 4889/5082 HCDR1
 <400> 48
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala Tyr Tyr
 1 5
 <210> 49
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 <223> 4889 HCDR2
 20 <400> 49
 Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn
 1 5
 <210> 50
 <211> 13
 <212> PRT
 25 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 <223> 4889 HCDR3
 <400> 50
 Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Gly Tyr Ser Asp Tyr Trp
 30 1 5 10
 <210> 51
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <220>

<221> característica diversa
 <223> 4935 HCDR1
 <400> 51
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
 1 5

5 <210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>

10 <221> característica diversa
 <223> 4935 HCDR2
 <400> 52
 Ile Tyr Pro Gly Asn Val His Thr
 1 5

15 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>

20 <221> característica diversa
 <223> 4935 HCDR3
 <400> 53
 Cys Val Arg Arg Tyr Gly Tyr Asp Gly Asp Trp Phe Ala Tyr Trp
 1 5 10 15

25 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>

30 <221> característica diversa
 <223> 5038 HCDR1
 <400> 54
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Tyr
 1 5

35 <210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> característica diversa
 <223> 5038 HCDR2
 <400> 55
 5 Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn
 1 5
 <210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 10 <220>
 <221> característica diversa
 <223> 5038 HCDR3
 <400> 56
 Cys Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Gly Asn Leu Phe Asp Tyr Trp
 1 5 10 15
 15 <210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 20 <221> característica diversa
 <223> 5082 HCDR2
 <400> 57
 Ile Gly Tyr Asp Gly Arg Asn
 1 5
 <210> 58
 25 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 30 <223> 5082 HCDR3
 <400> 58
 Cys Ser Arg Glu Gly Asp Tyr Gly Tyr Ser Asp Tyr Trp
 1 5 10
 <210> 59
 <211> 8
 35 <212> PRT

<213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 <223> 5101 HCDR1
 5 <400> 59
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5
 <210> 60
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 <223> 5101 HCDR2
 <400> 60
 15 Ile Arg Asp Gly Gly Gly Tyr Thr
 1 5
 <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20 <220>
 <221> característica diversa
 <223> 5101/5106 HCDR3
 <400> 61
 Cys Ala Arg Gly Ile Leu Asp Tyr Trp
 1 5
 25 <210> 62
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 30 <221> característica diversa
 <223> 5106 HCDR1
 <400> 62
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala
 1 5
 <210> 63
 35 <211> 8

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 5 <223> 5106 HCDR2
 <400> 63
 Ile Ser Asp Gly Gly Ser His Leu
 1 5
 <210> 64
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 <223> 5144 HCDR1
 15 <400> 64
 Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr Ser
 1 5
 <210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 <223> 5144/5259 HCDR2
 <400> 65
 Ile Trp Gly Gly Gly Ser Thr
 25 1 5
 <210> 66
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30 <220>
 <221> característica diversa
 <223> 5144 HCDR3
 <400> 66
 Cys Val Arg Lys Gly Ile Thr Thr Thr Gly Phe Asp Tyr Trp
 1 5 10
 35 <210> 67

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 5 <221> característica diversa
 <223> 5259 HCDR1
 <400> 67
 Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 68
 10 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 15 <223> 5259 HCDR3
 <400> 68
 Cys Ala Arg Lys Gly Ile Thr Thr Thr Gly Phe Asp Tyr Trp
 1 5 10
 <210> 69
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 <223> 4785/5143 LCDR1
 25 <400> 69
 Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr
 1 5 10
 <210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 <223> 4785 LCDR3
 <400> 70
 35 Cys Gln Ser Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe
 1 5 10

<210> 71
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5 <220>
 <221> característica diversa
 <223> 4889/5038/5101 LCDR1
 <400> 71
 Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 1 5
 10 <210> 72
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 15 <221> característica diversa
 <223> 4889 LCDR3
 <400> 72
 Cys Gln Gln Ser Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe
 1 5 10
 <210> 73
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 25 <223> 4935 LCDR1
 <400> 73
 Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Thr Phe
 1 5 10
 <210> 74
 <211> 11
 30 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> característica diversa
 <223> 4935 LCDR3
 35 <400> 74

Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr Phe
1 5 10

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> 5038 LCDR3

<400> 75

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

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <220>

<221> característica diversa

<223> 5082/5106 LCDR1

<400> 76

Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
1 5

20 <210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

25 <221> característica diversa

<223> 5082 LCDR3

<400> 77

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

<210> 78

30 <211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

35 <223> 5101 LCDR3

<400> 78

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

<210> 79

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> 5106 LCDR3

10 <400> 79

Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Ile Pro Tyr Thr Phe
1 5 10

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

<223> 5143 LCDR3

<400> 80

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

<210> 81

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

25 <220>

<221> característica diversa

<223> 5144/5259 LCDR1

<400> 81

Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

30 <210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

35 <221> característica diversa

<223> 5144 LCDR3

<400> 82

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

<210> 83

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> característica diversa

10 <223> 5259 LCDR3

<400> 83

Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Pro Thr Phe
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una composición de anticuerpos que comprende al menos una primera y una segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 humano que se unen a distintos epítomos de HER3, en la que:
- 5 a) dicha primera molécula de anticuerpo anti-HER3 humano comprende CDR1-3 de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 48, 57, y 58, respectivamente, y CDR1-3 de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 76, YTS, y SEQ ID NO: 77, respectivamente; y
- 10 b) dicha segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 humano comprende CDR1-3 de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 54, 55, y 56, respectivamente, y CDR1-3 de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, HTS, y SEQ ID NO: 75, respectivamente.
2. La composición de anticuerpos de la reivindicación 1, en la que:
- 15 a) la primera molécula de anticuerpo anti-HER3 humano comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, y una cadena ligera que comprende el dominio variable de cadena ligera en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; o una variante humanizada de los mismos; y
- 20 b) la segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 humano comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y una cadena ligera que comprende el dominio variable de cadena ligera en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o una variante humanizada de los mismos.
3. La composición de anticuerpos de la reivindicación 2, en la que:
- 25 a) la primera molécula de anticuerpo anti-HER3 humano comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y un dominio constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; o una variante humanizada de los mismos; y
- 30 b) la segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 humano comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o una variante humanizada de los mismos.
4. La composición de anticuerpos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además una tercera molécula de anticuerpo anti-HER3 humano, distinta de las moléculas de anticuerpo primera y segunda.
5. La composición de anticuerpos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que al menos una molécula de anticuerpo anti-HER3 humano en dicha composición es un inmunocombinado que comprende un anticuerpo anti-HER3 humano conjugado a un agente contra el cáncer.
- 35 6. Una molécula de unión biespecífica que se une a HER3, que comprende las CDR1-3 de cadena pesada y ligera de las moléculas de anticuerpo primera y segunda de la composición de anticuerpos de la reivindicación 1.
7. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de una molécula de anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 40 8. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7.
9. Una estirpe celular policlonal capaz de expresar la composición de anticuerpos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha estirpe celular policlonal comprende células hospedantes capaces cada una de expresar un anticuerpo anti-HER3 humano de la composición.
- 45 10. Un método para producir una composición de anticuerpos que comprende al menos dos moléculas de anticuerpo recombinante anti-HER3 humano, comprendiendo el método:
- 50 a) proporcionar al menos una primera célula hospedante y una segunda célula hospedante, en el que la primera célula hospedante es capaz de expresar la primera molécula de anticuerpo anti-HER3 humano como se define en la reivindicación 1, y la segunda célula hospedante es capaz de expresar la segunda molécula de anticuerpo anti-HER3 humano como se define en la reivindicación 1;
- b) cultivar dichas células hospedantes en condiciones adecuadas para la expresión de las moléculas de anticuerpo; y

c) aislar las moléculas de anticuerpo.

11. El método de la reivindicación 10, en el que las células hospedantes se cultivan en un solo biorreactor.
12. Una composición farmacéutica que comprende la composición de anticuerpos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la molécula de unión biespecífica de la reivindicación 6, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, para uso en la prevención, tratamiento o mejora de uno o más síntomas asociados con cáncer en un paciente humano
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, para uso en el tratamiento de cáncer o un trastorno caracterizado por la expresión de HER3 en un paciente humano.
- 10 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, para uso en el tratamiento de cáncer caracterizado por la sobreexpresión de HER3 en un paciente humano.

Figura 1

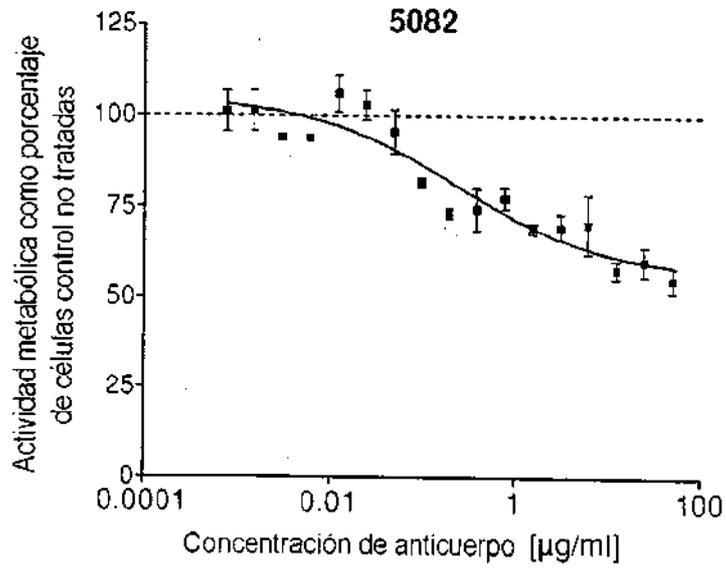


Figura 2

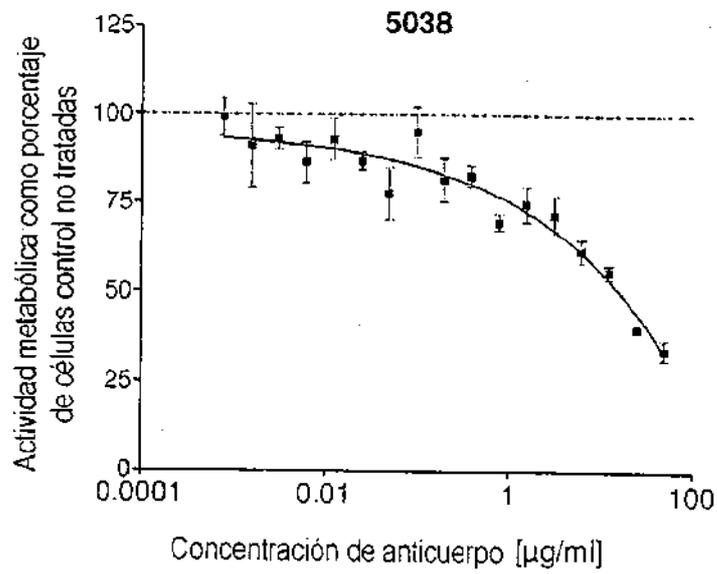


Figura 3

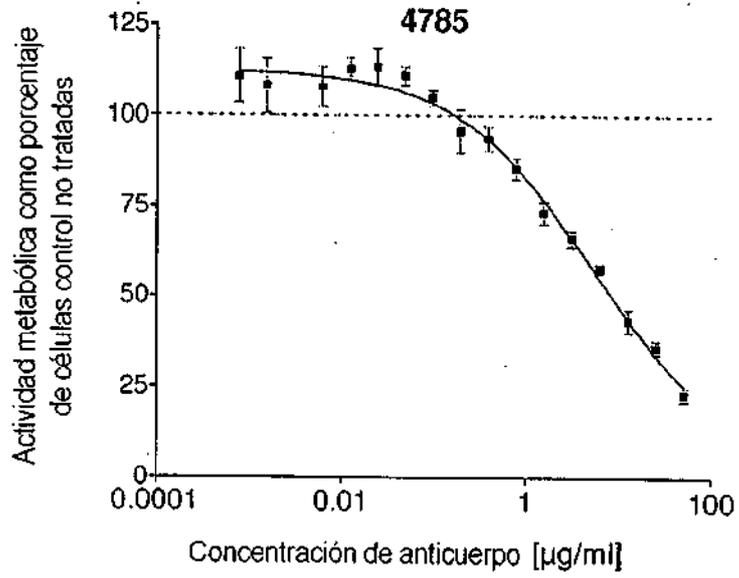


Figura 4

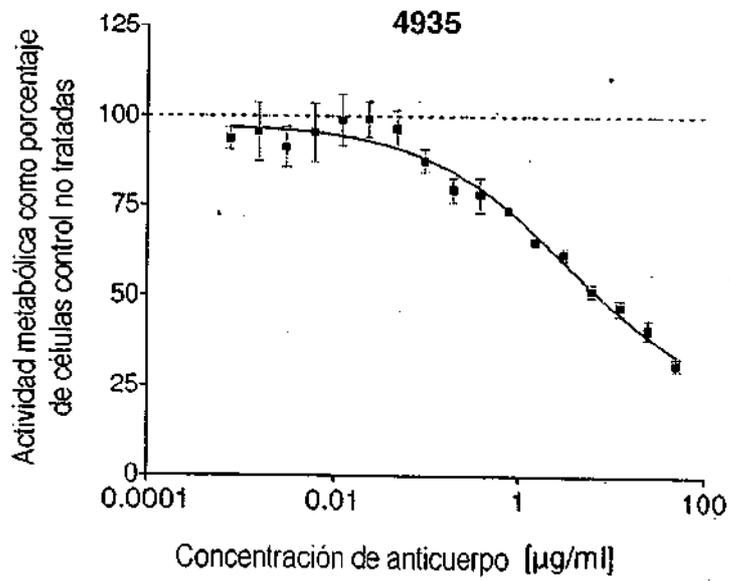


Figura 5

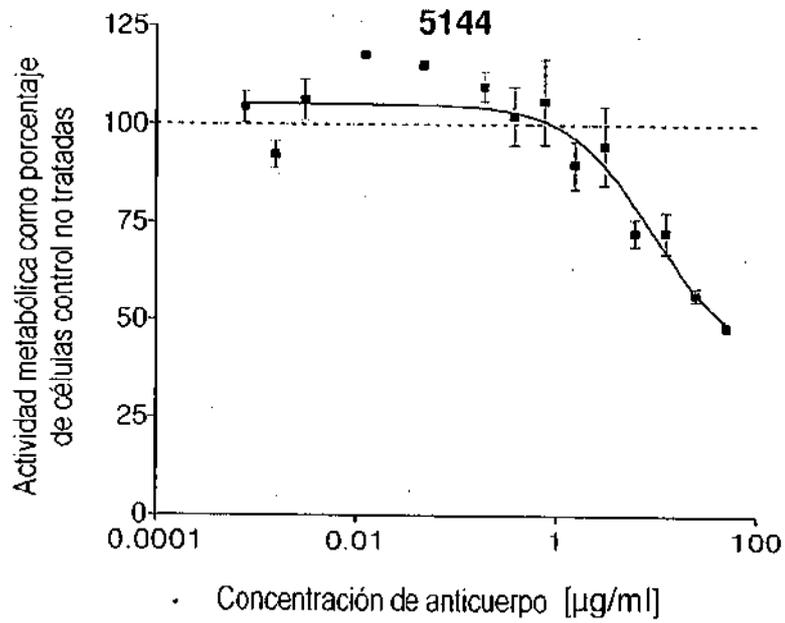


Figura 6

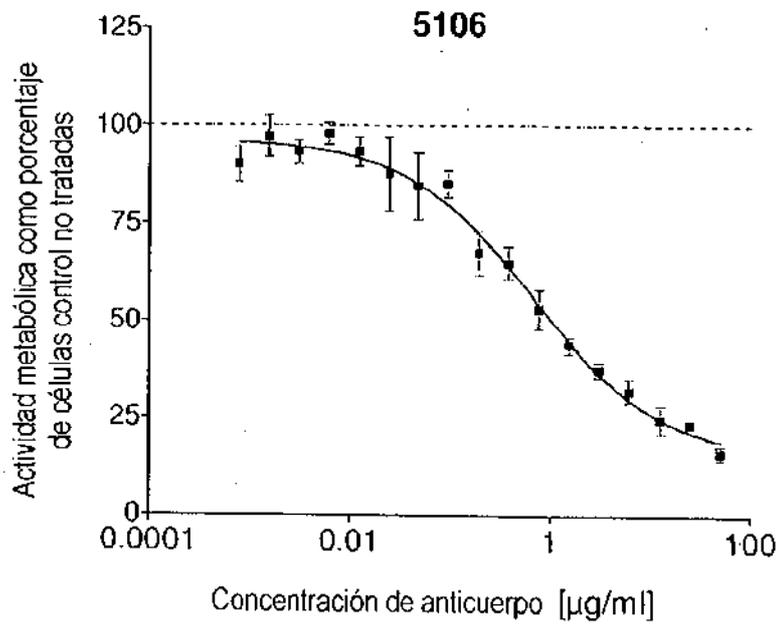


Figura 7

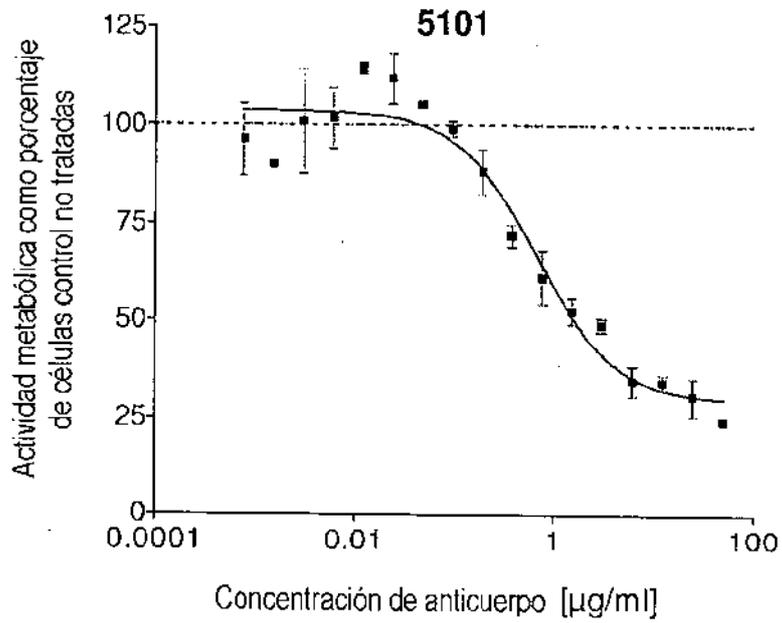


Figura 8

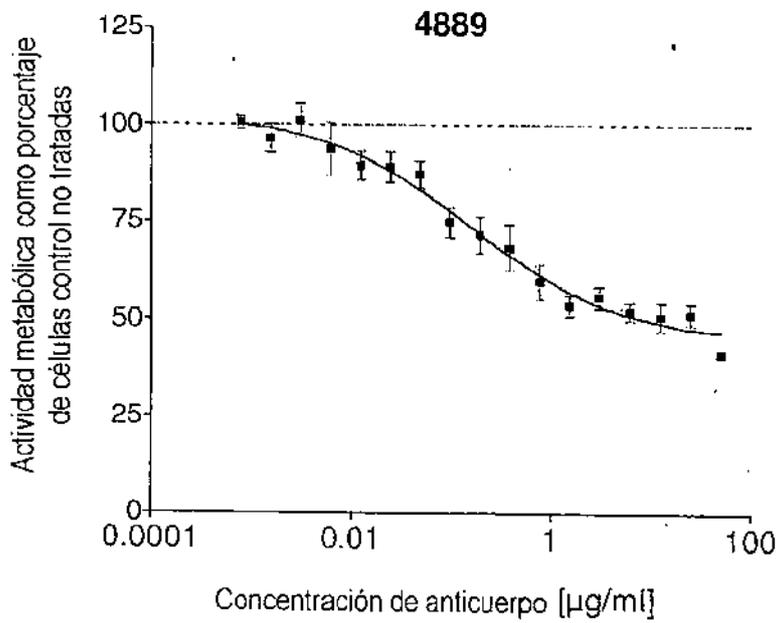


Figura 9

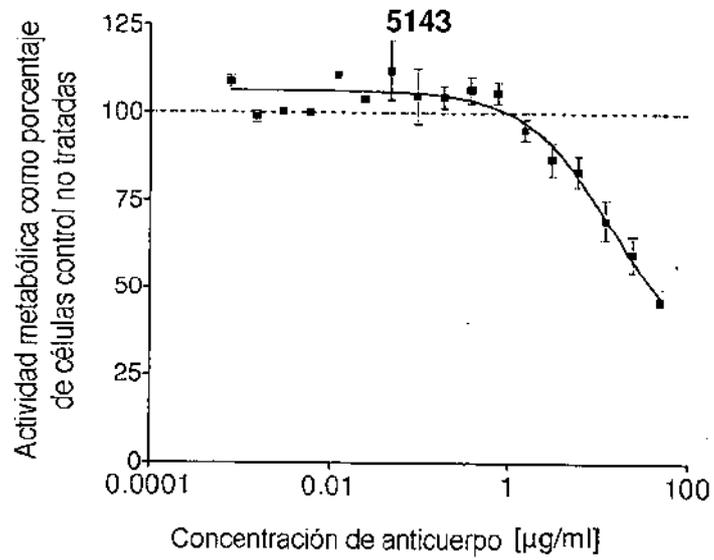


Figura 10

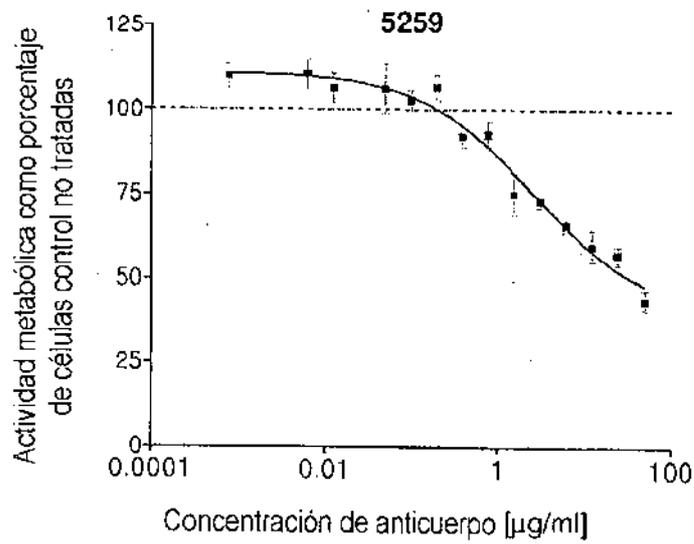


Figura 11

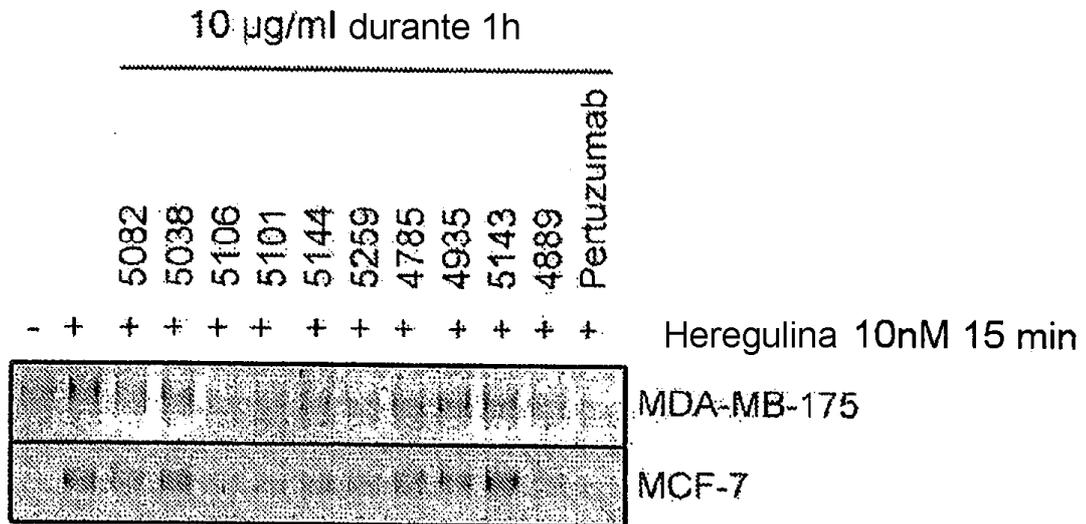


Figura 12

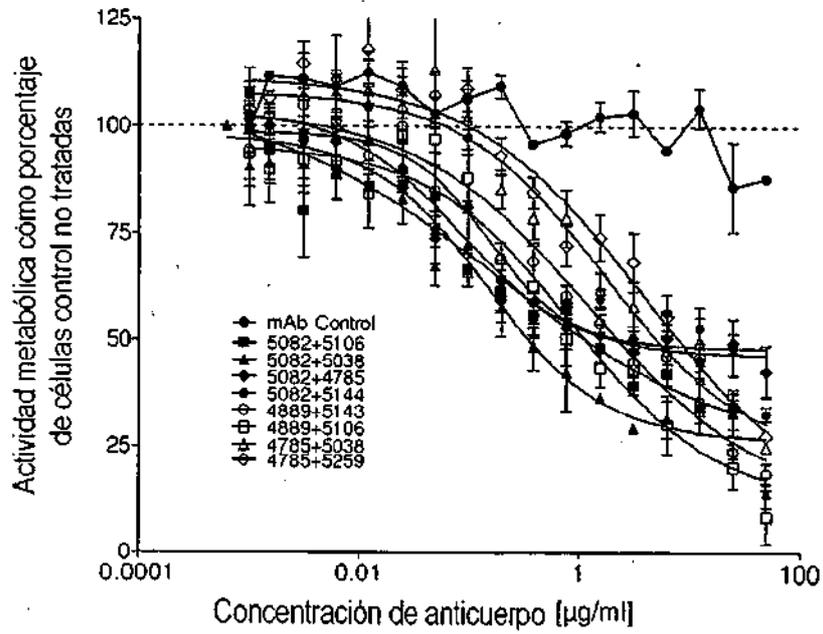


Figura 13

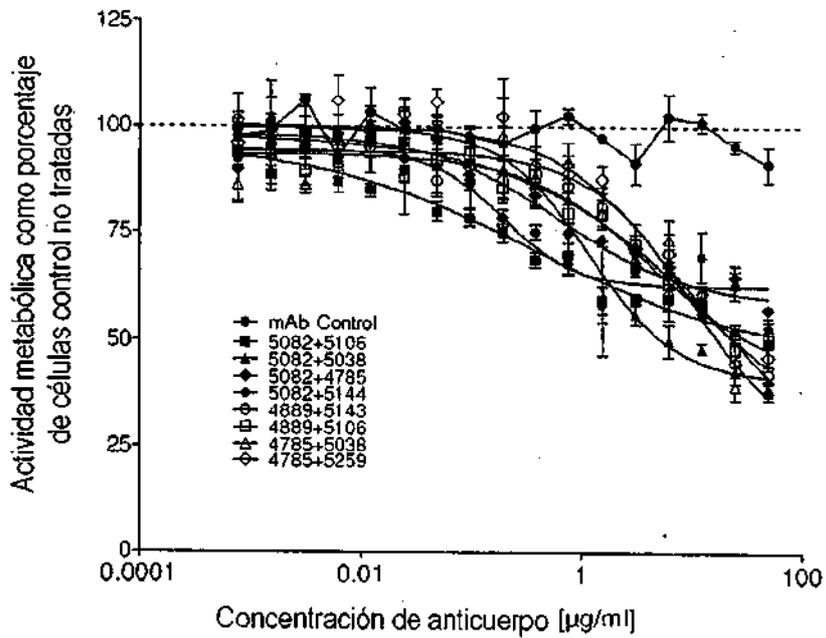


Figura 14

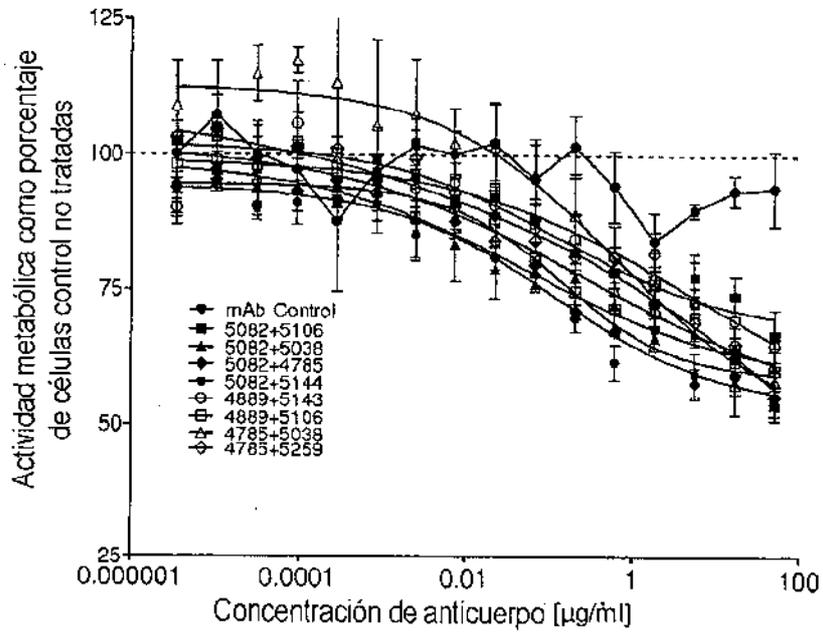


Figura 15

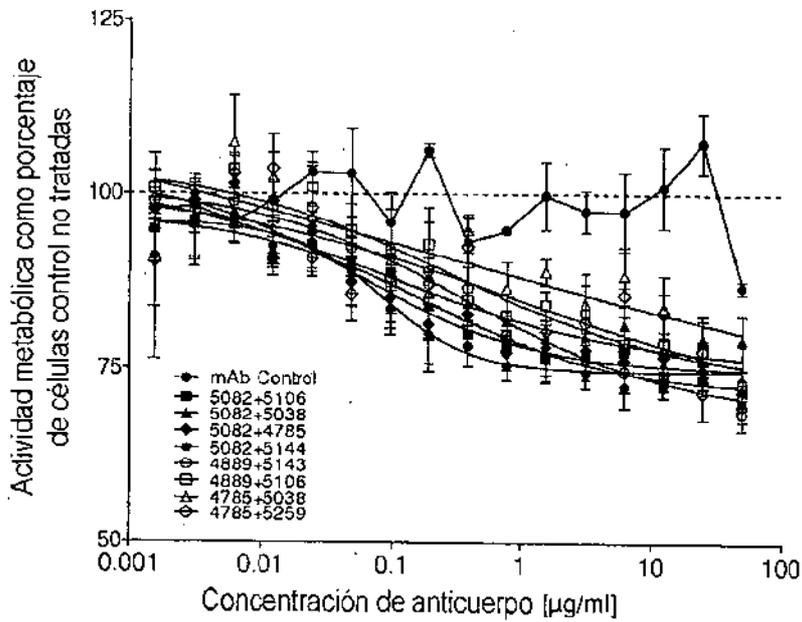


Figura 16

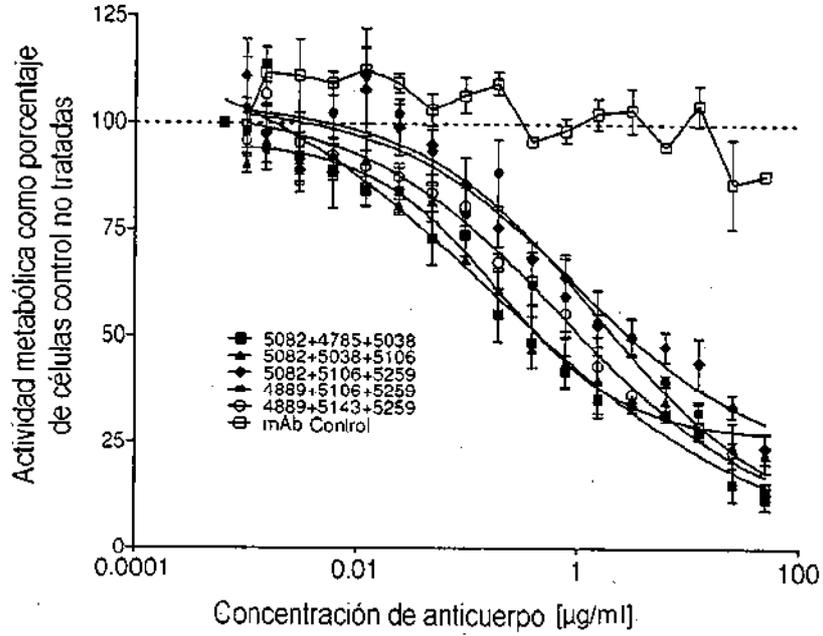


Figura 17

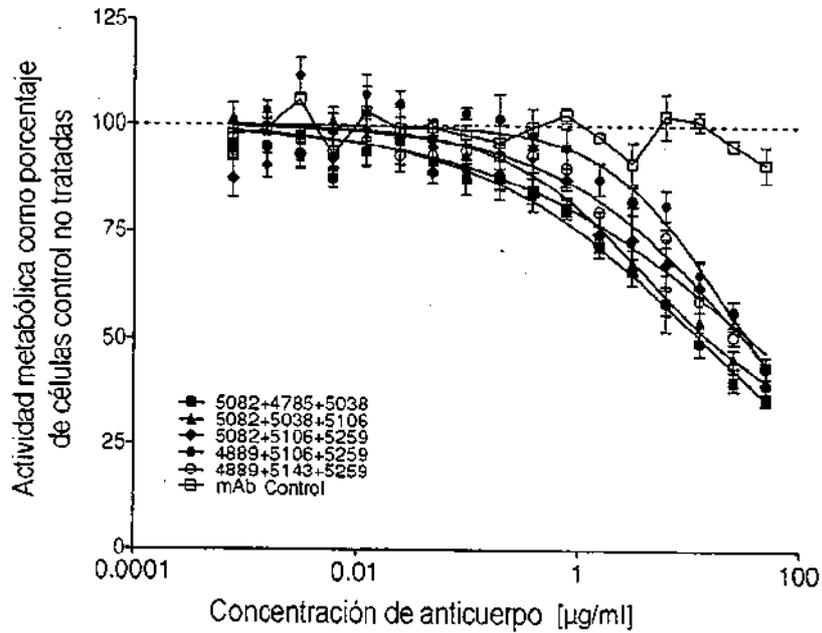


Figura 18

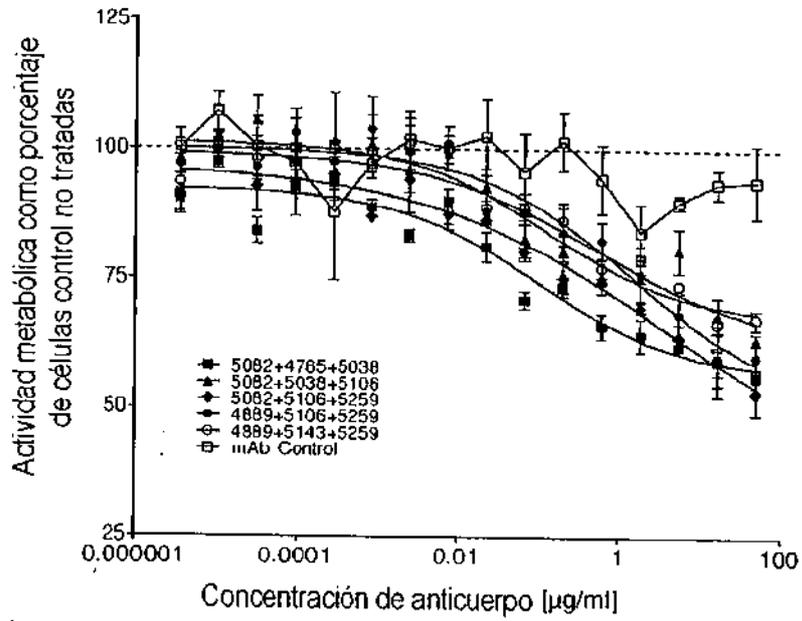


Figura 19

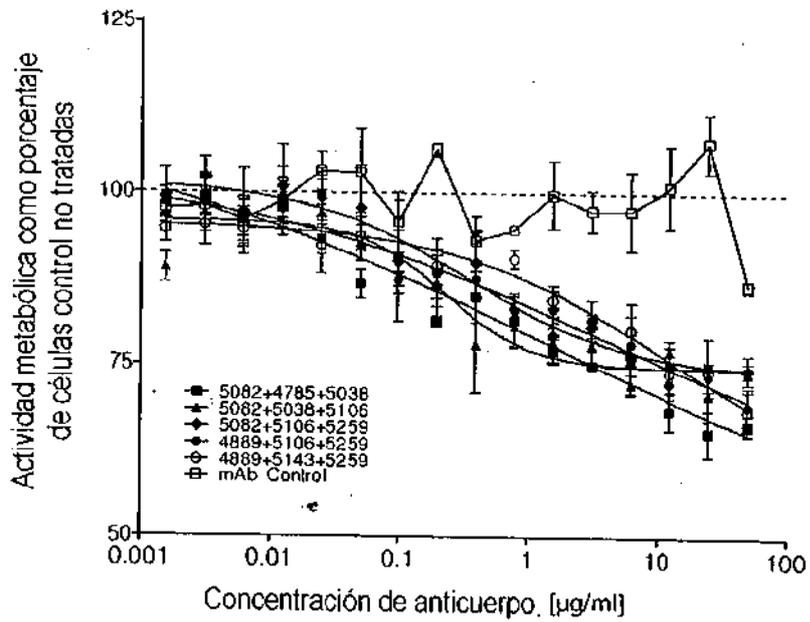


Figura 20

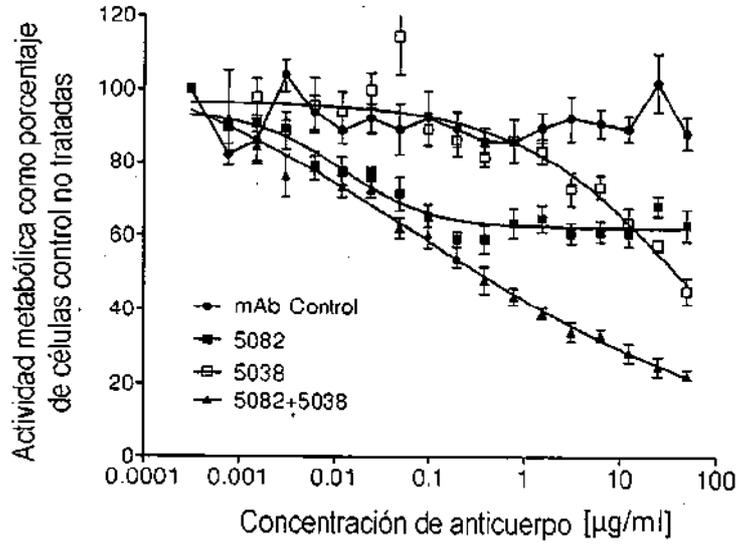


Figura 21

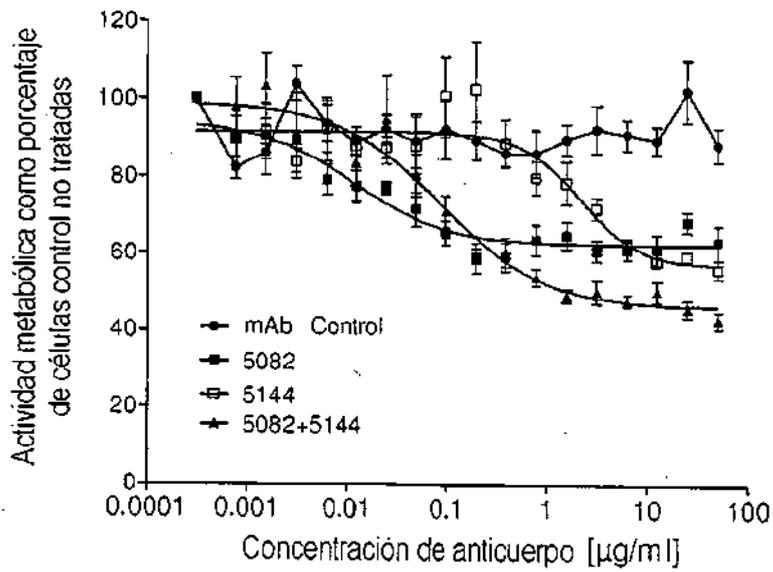


Figura 22

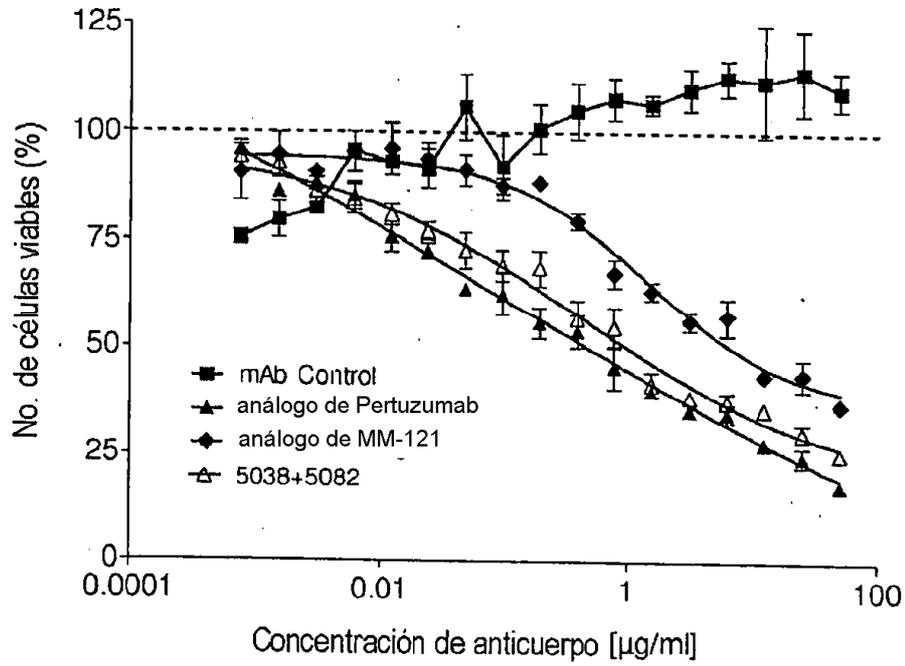


Figura 23

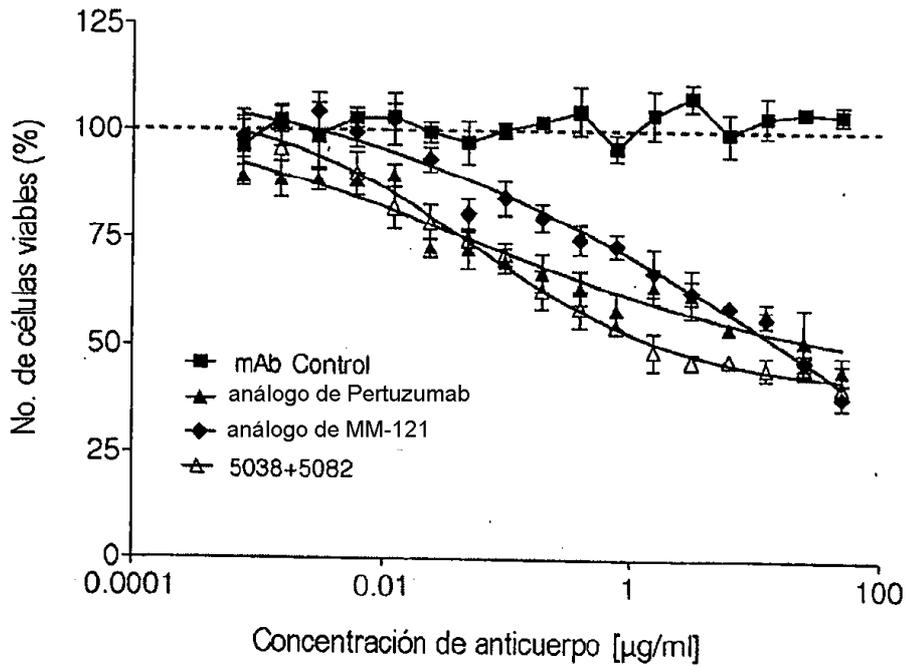


Figura 24

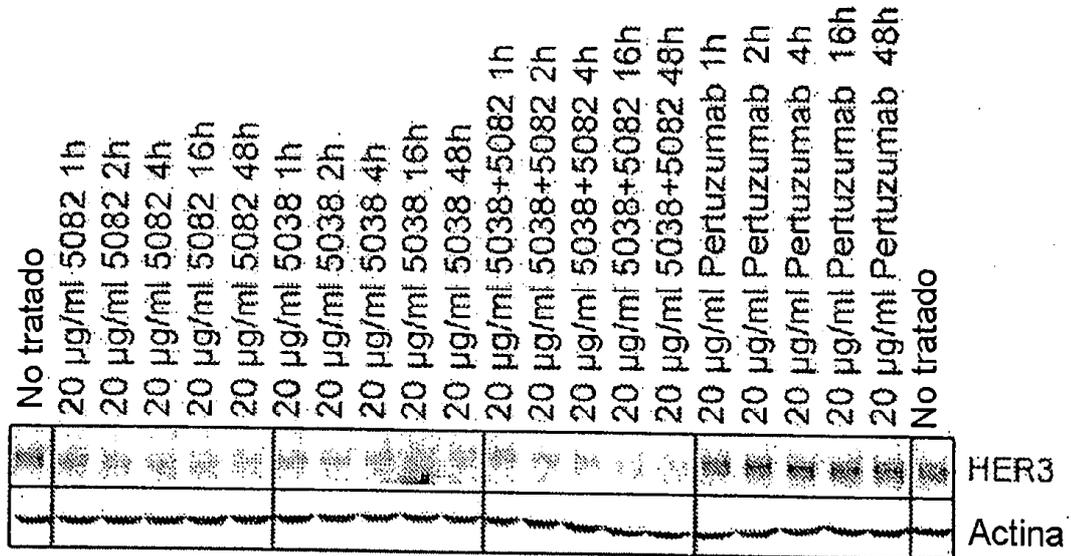


Figura 25

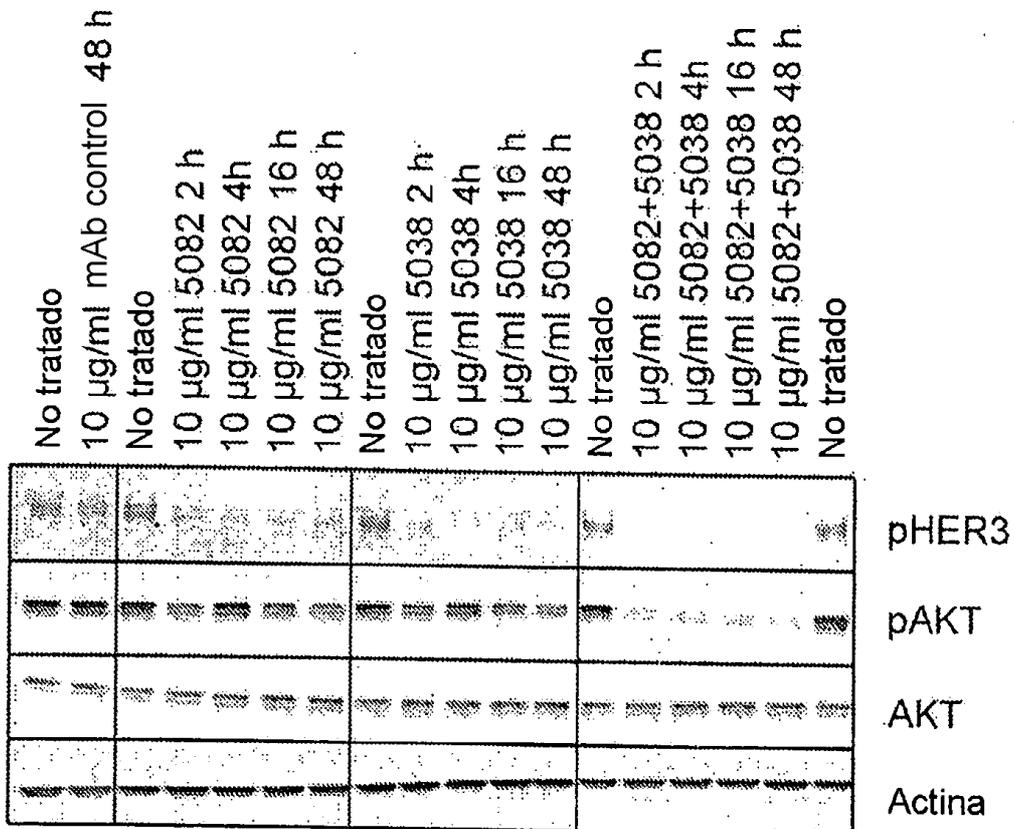


Figura 26

A549

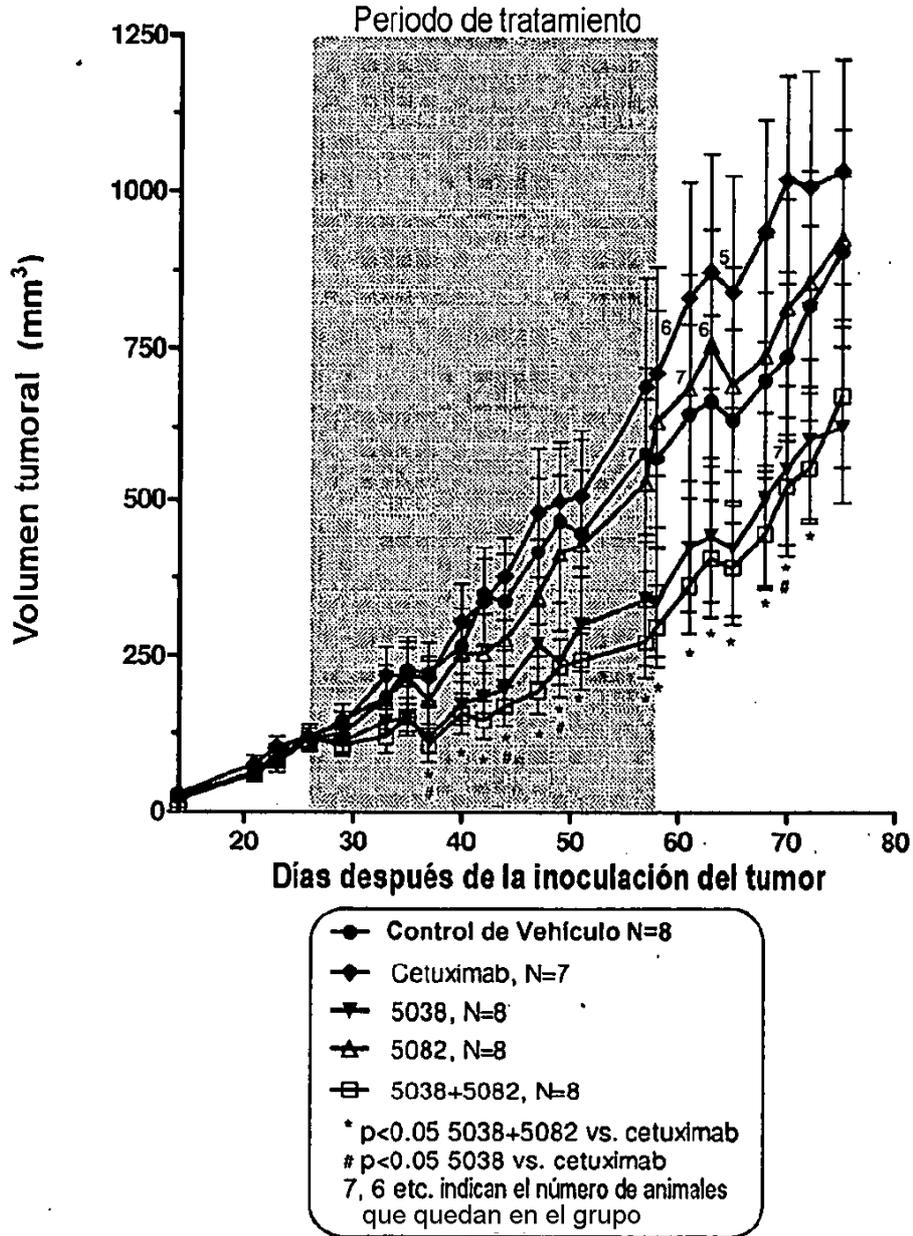


Figura 27

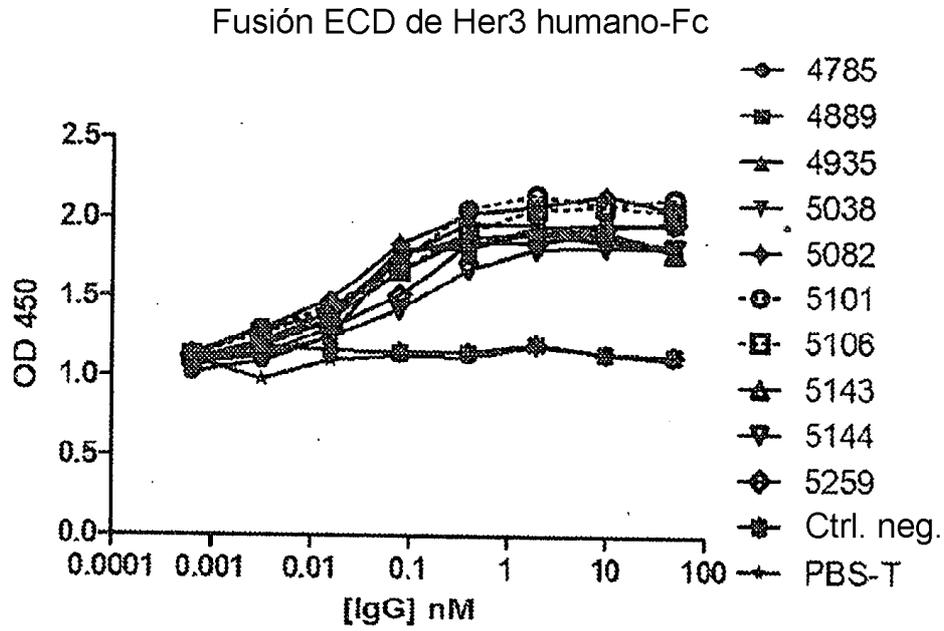


Figura 28

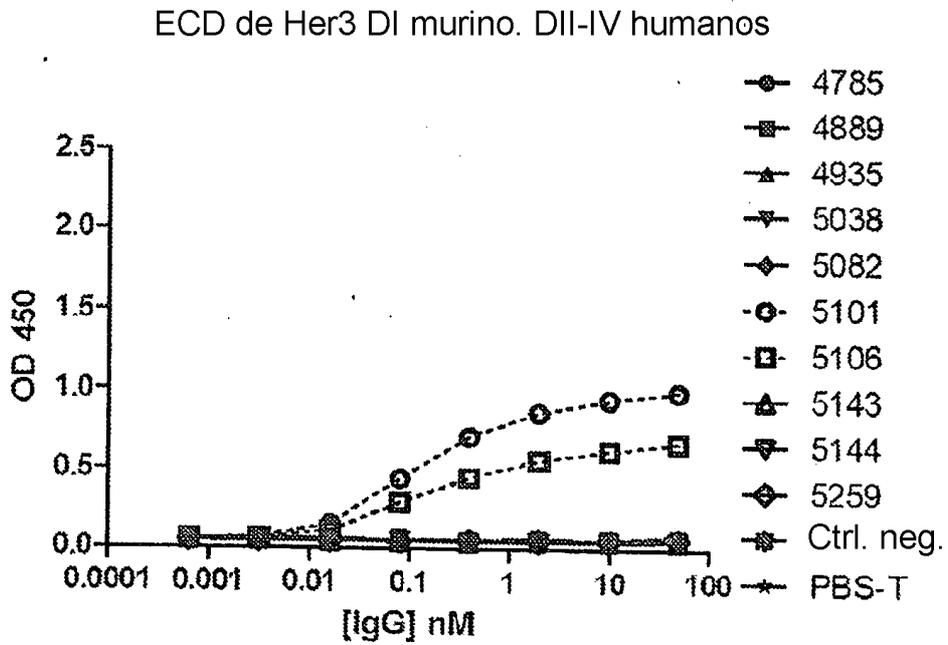


Figura 29

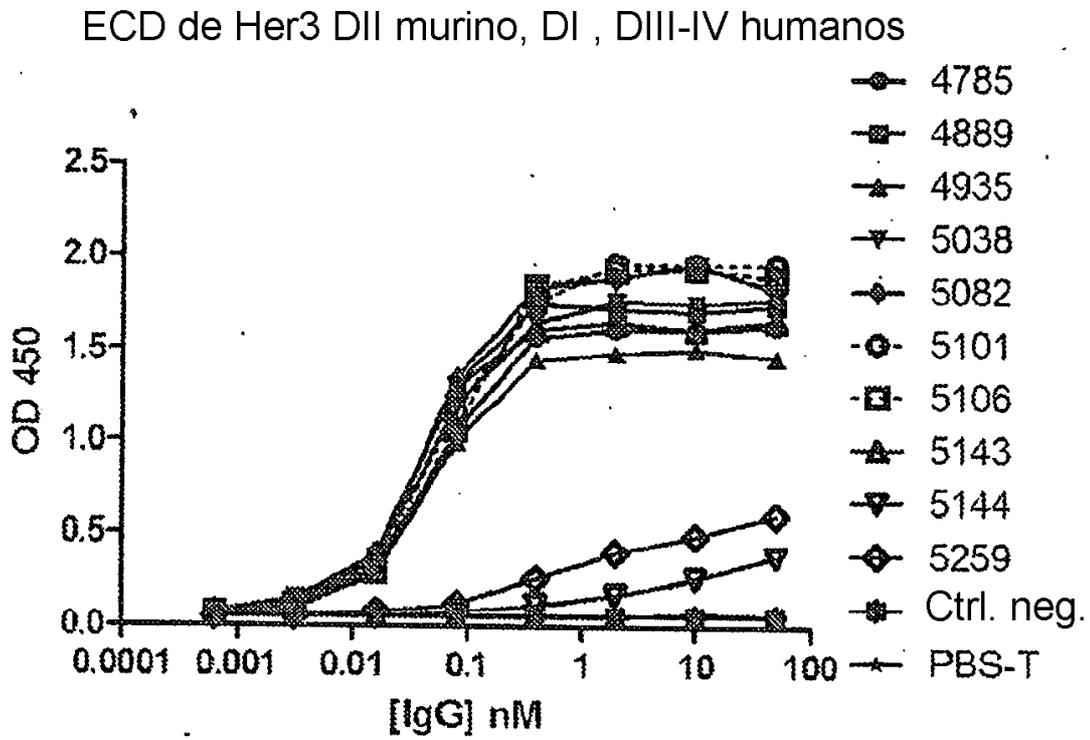


Figura 30

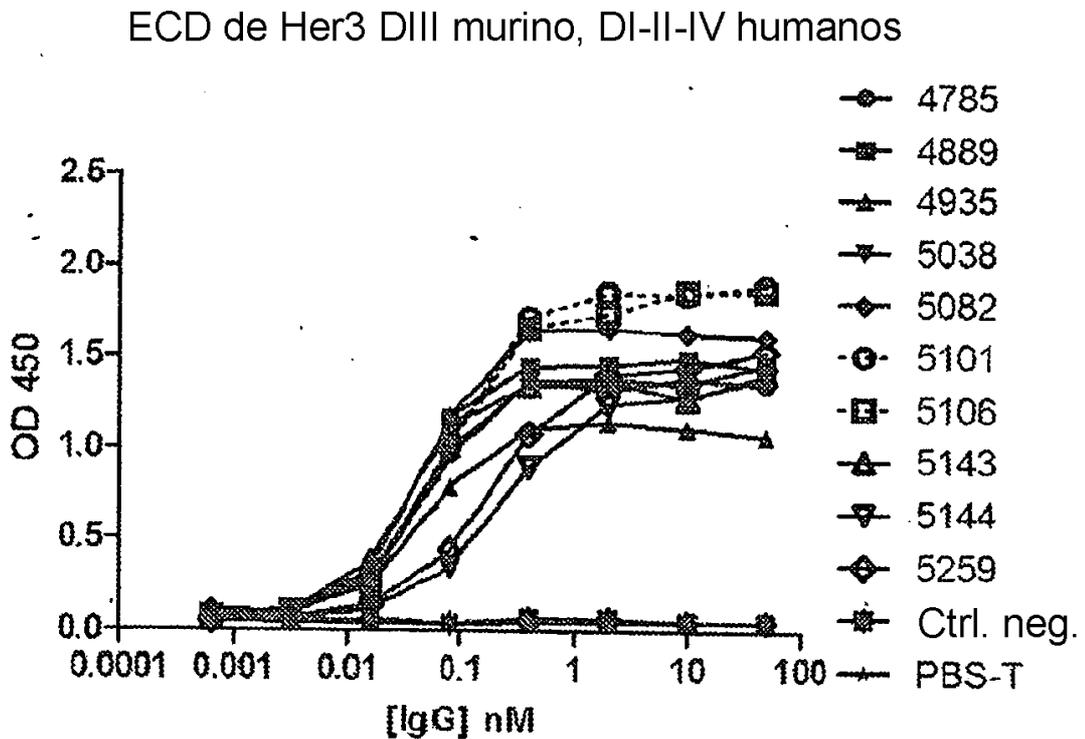


Figura 31

ECD de Her3 DIV murino, DI-III humanos

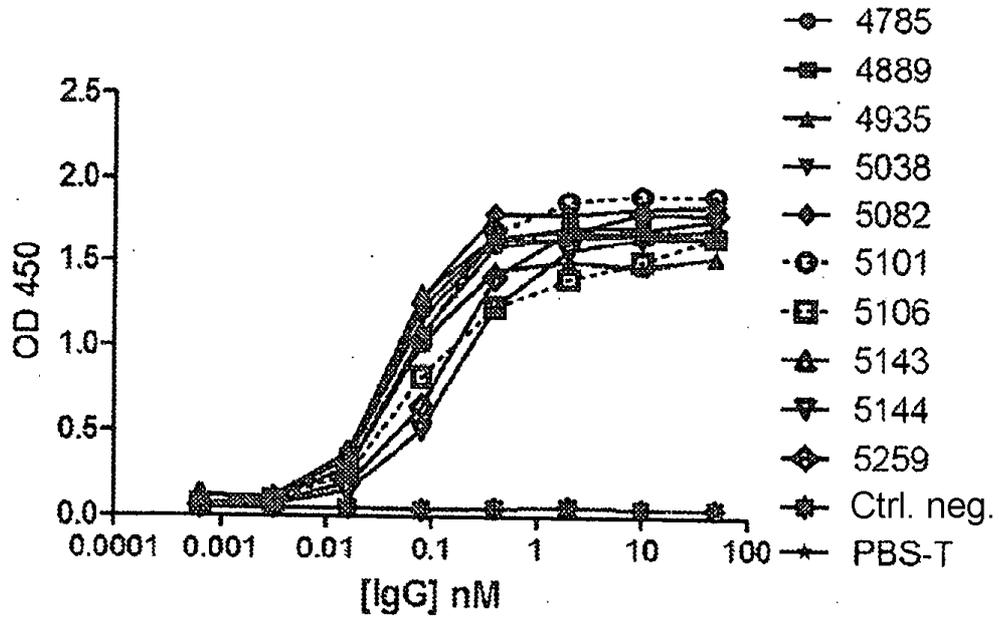


Figura 32

ECD de Her3 murino

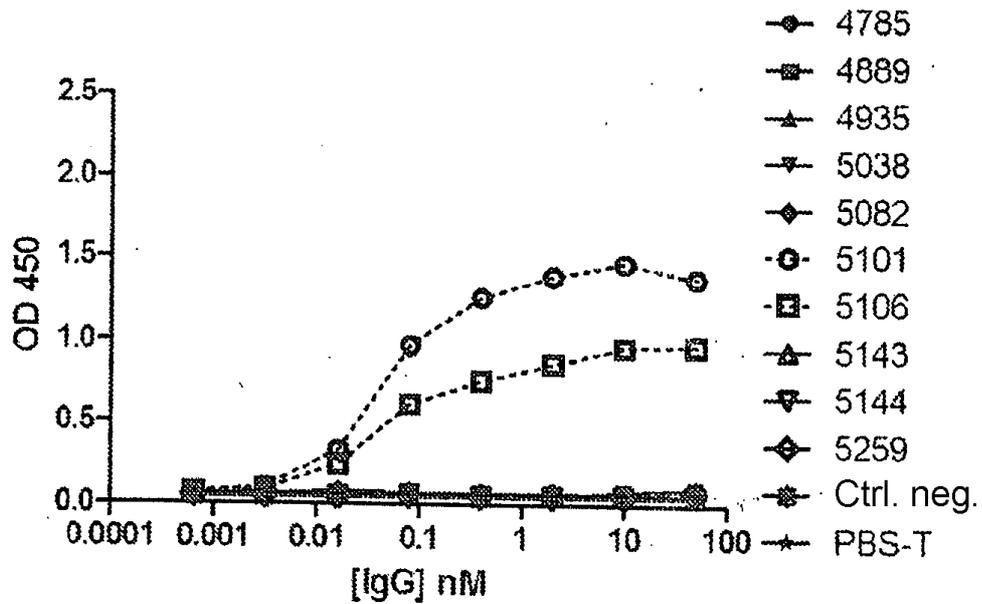


Figura 33

	Dominio I				Dominio I / Her3 Murino				Dominio I / II	
	Agrupamiento epitópico I	5082	4889	5038	Agrupamiento epitópico III	5101	5106	5144	5259	
4785	96	8	-1	3	1	1	0	0	0	
4935	97	5	0	3	0	0	0	0	-1	
5143	98	62	-3	-1	-1	-1	-1	-1	-4	
5082	99	99	96	-1	-1	0	0	0	0	
4889	3	99	98	0	0	1	2	1	1	
5038	5	0	-1	96	1	1	0	0	0	
5101	28	28	30	28	92	90	28	24	24	
5106	6	8	1	7	93	91	8	2	2	
5144	-4	14	9	-8	6	7	81	80	80	
5259	-4	15	10	-5	5	9	84	84	84	

Figura 34

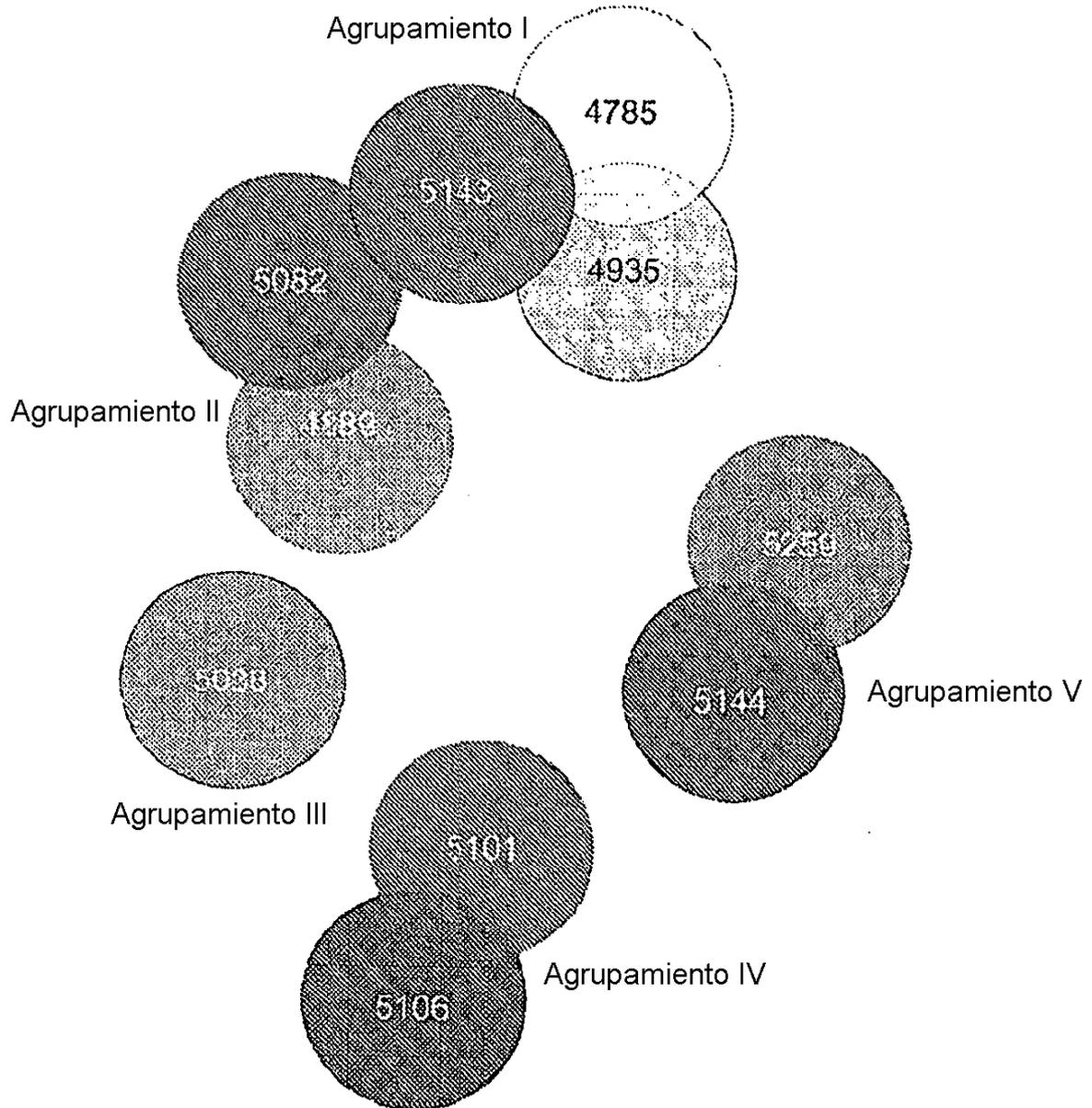


Figura 35

BxPC3

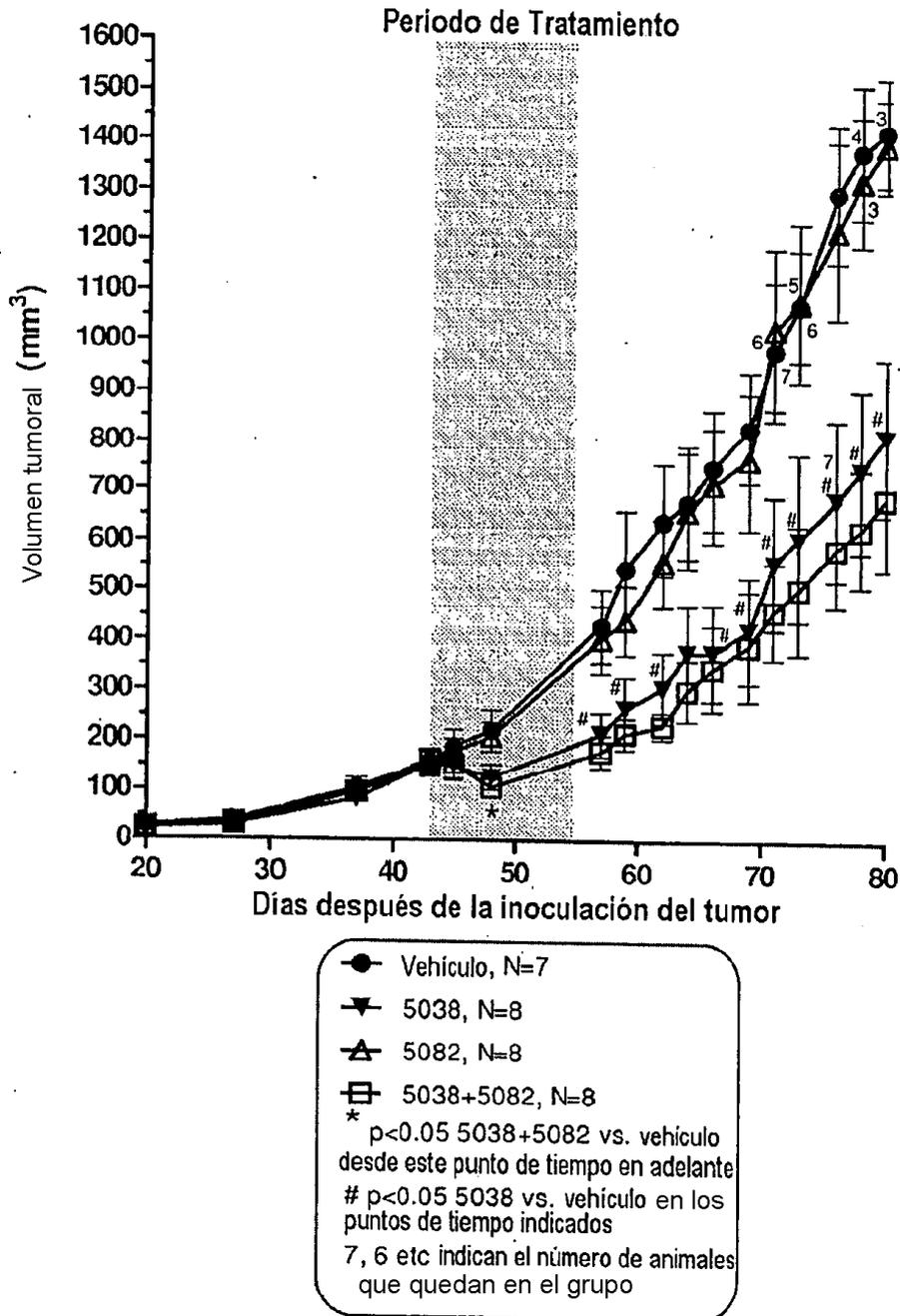
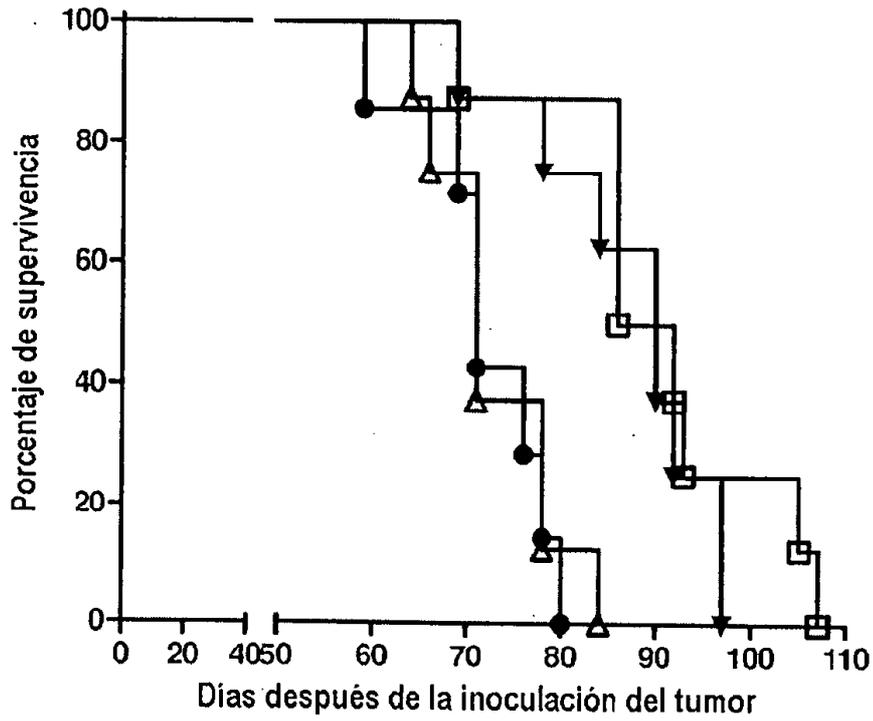


Figura 36

BxPC3

Primera mediada del tumor >1000mm³



● Vehículo, N=7
 ▼ 5038, N=8
 ▲ 5082, N=8
 ◻ 5038+5082, N=8
 Prueba de rango log (Mantel Cox):
 p = 0.003, 5038 vs. vehículo y
 p = 0.001 5038+5082 vs. vehículo.