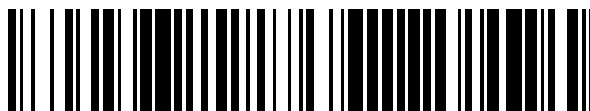


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 707**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2014 PCT/KR2014/004317**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14185704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2014 E 14798440 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2998319**

54 Título: **Anticuerpo que se une específicamente a HER2**

30 Prioridad:

**16.05.2013 KR 20130055912**

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

**26.04.2019**

73 Titular/es:

**ABCLON INC. (100.0%)  
No.1403, Ace Twin Tower 1 212-1 Guro-dong  
Guro-gu  
Seoul 152-779, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, JONG-SEO;  
KIM, KYU-TAE;  
LEE, YOUNG-HA;  
LEE, SOOK-YEON;  
HWANG, IN-SIK y  
KO, BONG-KOOK**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 710 707 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**

Anticuerpo que se une específicamente a HER2

5 Campo de la invención

La presente invención se realizó con el apoyo del Korea Institute for the Advancement of Technology bajo la subvención 1415118385 desde el 1 de noviembre de 2011 hasta el 1 de octubre de 2014 y la gestión del Equipo de Apoyo para la Cooperación Internacional del KIAT, titulada "International Cooperation Technology Development Works and Innovative Epitope Discovery Platform Technology-Based Global Antibody New Drug Development", realizado por AbClon, Inc.

10

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente coreana N.º 10-2013-0055912, presentada el 16 de mayo de 2013, en la Oficina de la Propiedad Intelectual de la República de Corea.

15

La presente invención se refiere a anticuerpos contra HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) para prevenir o tratar enfermedades relacionadas con HER2, particularmente, cánceres.

Descripción de la técnica relacionada

20

El gen HER2/neu(ErbB2) codifica una glucoproteína transmembrana de 185 kDa, que es uno de los miembros de la familia de EGFR (receptores del factor de crecimiento epidérmico). La proteína HER2 consiste en un dominio extracelular con 620 residuos de aminoácidos, un dominio transmembrana con 23 residuos de aminoácidos y un dominio intracelular que tiene actividad tirosina cinasa con 490 residuos de aminoácidos (Akiyama T, et al., Science, 232(4758):1644-1646(1986)).

25

Además, los anticuerpos contra HER2 con diversas características se describen en una serie de documentos: Tagliabue et al., Int. J. Cancer 47:933-937 (1991); McKenzie et al., Oncogene 4:543-548 (1989); Maier et al., Cancer Res. 51:5361-5369 (1991); Bacus et al., Molecular Carcinogenesis 3:350-362 (1990); Stancovski et al., PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991); Bacus et al., Cancer Research 52:2580-2589 (1992); Xu et al., Int. J. Cancer 53:401-408 (1993); el documento WO94/00136; Kasprzyk et al., Cancer Research 52:2771-2776 (1992); Hancock et al., Cancer Research. 51:4575-4580 (1991); Shawver et al., Cancer Res. 54:1367-1373 (1994); Arteaga et al., Cancer Res. 54:3758-3765 (1994); Harwerth et al., J. Biol. Chem. 267:15160-15167 (1992); patente de Estados Unidos n.º 5.783.186; Kao et al., publicación estadounidense n.º 2009/0285837 (2009); Ross et al., The Oncologist 8:307-325 (2003) y Klapper et al., Oncogene 14:2099-2109 (1997).

30

35

Entre los anticuerpos contra HER2, trastuzumab como el anticuerpo de mayor éxito comercial (comercializado como Herceptin™, patente de Estados Unidos n.º 5.821.337) se ha estudiado intensivamente: Sapino, A., et al., Annals of Oncology (2007) 18: 1963-1968; Bussolati, G, et al., British Journal of Cancer (2005) 92, 1261-1267; y Glazyrin A, et al., J Histology & Cytochemistry (2007) 55(1):25-33.

40

A pesar de que el trastuzumab ha tenido éxito comercial, es probable que este anticuerpo muestre eficacia terapéutica en solo el 15 % de los pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan HER2. Por lo tanto, se han realizado intentos para mejorar el pronóstico de los pacientes con cáncer que no responden o que responden mal al trastuzumab mediante una terapia de combinación, en el contexto de mejorar el alcance o el espectro de eficacias de trastuzumab.

45

Por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2011-0086004 divulga una terapia combinada contra el cáncer con trastuzumab e IL-21. La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2012-0107270 describe el trastuzumab en combinación con anticuerpo dirigido a tenascina-C conjugado con IL-2.

50

La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005-0101618 divulga una terapia contra el cáncer con trastuzumab y ligando erbB2. La publicación de solicitud de patente europea n.º 2134364 divulga la inhibición de la proliferación de células cancerosas por trastuzumab en combinación con inhibidores de la telomerasa. El documento WO 2008/031531 describe que el trastuzumab en combinación con pertuzumab puede suprimir la metástasis del cáncer.

55

El documento WO 2012/143523 divulga anticuerpos biespecíficos que comprenden regiones de unión a antígeno a dos epítomos diferentes del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y composiciones y moléculas relacionadas basadas en anticuerpos. También se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y métodos de preparación y uso de los anticuerpos.

60

**PROBLEMAS TECNOLÓGICOS A RESOLVER**

Los inventores de la presente invención han realizado investigaciones intensivas para desarrollar anticuerpos capaces de prevenir o tratar enfermedades relacionadas con HER2, particularmente cánceres (más particularmente

65

cáncer de mama y cáncer de estómago). En particular, los inventores de la presente invención han realizado investigaciones intensivas para desarrollar anticuerpos en combinación con trastuzumab capaces de superar las limitaciones en eficacias antineoplásicas asociadas con el tratamiento con trastuzumab como agente único. Como resultado, los inventores de la presente invención han desarrollado anticuerpos novedosos que tienen eficacias antineoplásicas significativas *per se*, y eficacias mucho más altas en combinación con trastuzumab para la prevención o el tratamiento de cánceres (particularmente cáncer de mama y cáncer de estómago, y más particularmente cáncer de mama y cáncer de estómago que expresan HER2).

La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, composiciones farmacéuticas, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos para su uso en la prevención o el tratamiento de un cáncer, composiciones farmacéuticas para su uso en la prevención o el tratamiento de un cáncer, composiciones farmacéuticas para su uso en la inducción de apoptosis, y kits para su uso en el diagnóstico de un cáncer, como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, Un objetivo de esta invención es proporcionar un anticuerpo contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

(i) una región variable de cadena pesada que comprende una región determinante de complementariedad (CDR)H1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6;

(ii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:218;

(iii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:239;

(iv) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:88;

(v) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:76 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6;

(vi) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:43 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6;

(vii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:84 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6;

(viii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:85 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6;

(ix) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:76 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:222;

(x) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:67 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:156;

(xi) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:109;

(xii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:76 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:157;

(xiii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:67 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:154;

(xiv) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:220;

(xv) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:64 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:178;

(xvi) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:64 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6;

(xvii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:71 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:155;

5 (xviii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:131;

(xix) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:71 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6 o

10 (xx) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:83 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6.

15 Se divulga una molécula de ácido nucleico que codifica el presente anticuerpo contra HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Se divulga un vector recombinante que porta la molécula de ácido nucleico.

20 Se divulga una célula huésped transfectada con el vector recombinante.

Es otro objetivo de esta invención proporcionar una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de un cáncer, que comprende: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo contra HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Es otro objetivo más de esta invención proporcionar una composición farmacéutica para su uso en la inducción de apoptosis, que comprende: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo contra HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

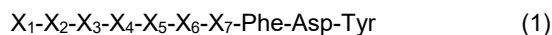
30 Otros objetivos y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con las reivindicaciones y dibujos adjuntos.

Descripción detallada de esta invención

35 Se divulga un anticuerpo contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una región determinante de complementariedad (CDR)H1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 representada por la siguiente fórmula 1; y

40 (b) una región variable de cadena ligera:



45 en la que X<sub>1</sub> representa His, Asn, Ser o Ala; X<sub>2</sub> representa Leu, Phe, Tyr, His, Met, Trp, Asn, Ile o Ala; X<sub>3</sub> representa Gly o Cys; X<sub>4</sub> representa Gly o Ser; X<sub>5</sub> representa Thr, Met o Ala; X<sub>6</sub> representa Ala, Ser, Gly o Thr; y X<sub>7</sub> representa Ser, Ala, Cys o Thr.

50 Los inventores de la presente invención han realizado investigaciones intensivas para desarrollar anticuerpos capaces de prevenir o tratar enfermedades relacionadas con HER2, particularmente cánceres (más particularmente cáncer de mama y cáncer de estómago). En particular, los inventores de la presente invención han realizado investigaciones intensivas para desarrollar anticuerpos en combinación con trastuzumab capaces de superar las limitaciones en eficacias antineoplásicas asociadas con el tratamiento con trastuzumab como agente único. Como resultado, los inventores de la presente invención han desarrollado anticuerpos novedosos que tienen eficacias antineoplásicas significativas *per se*, y eficacias mucho más altas en combinación con trastuzumab para la prevención o el tratamiento de cánceres (particularmente cáncer de mama y cáncer de estómago, y más particularmente cáncer de mama y cáncer de estómago que expresan HER2).

El anticuerpo de esta invención tiene una capacidad de unión específica a HER2. En particular, el presente anticuerpo se une a un epítipo en HER2 diferente de un epítipo al que está unido el trastuzumab.

60 El término usado en el presente documento "trastuzumab" se refiere a un anticuerpo divulgado en la patente de Estados Unidos n.º 5.821.337.

65 El anticuerpo de la invención muestra efectos de citotoxicidad o inhibición de la proliferación contra diversas células cancerosas que expresan HER2. No se pretende establecer una distinción entre los términos "citotoxicidad" e "inhibición de la proliferación" junto con las células cancerosas, y estos términos se usan indistintamente en el presente documento.

El término usado en el presente documento "anticuerpo" se refiere a anticuerpos específicos para HER2 que incluyen un anticuerpo completo así como cualquier fragmento de unión a antígeno de anticuerpos.

El anticuerpo completo incluye dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa, y cada cadena ligera está unida a la cadena pesada mediante un enlace disulfuro. La región constante de cadena pesada incluye cinco isotipos diferentes ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) que se clasifican en subgrupos de  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . La región constante de cadena ligera incluye dos isotipos diferentes ( $\kappa$  y  $\lambda$ ) (Cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M. J., Ed., Capítulo 45, págs. 41-50, W. B. Saunders Co. Philadelphia, PA(1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2ª Ed., Capítulo 4, págs. 45-65, sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984)).

Fragmento de unión a antígeno se refiere a cualquier fragmento de anticuerpo capaz de unirse a un antígeno incluyendo Fab,  $F(ab')$ ,  $F(ab')_2$ , Fv y así sucesivamente. Fab tiene un sitio de unión a antígeno que está compuesto por dominios variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo, un dominio constante de cadena ligera y el primer dominio constante ( $CH_1$ ) de cadena pesada.  $Fab'$  es diferente de Fab en el sentido de que hay una región bisagra que contiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio  $CH_1$  de cadena pesada. El anticuerpo  $F(ab')_2$  se produce formando un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína de la región bisagra de  $Fab'$ . Fv es un fragmento de anticuerpo mínimo compuesto por regiones variables de cadena pesada y cadena ligera, y la técnica recombinante para preparar un fragmento Fv se divulga en los documentos PCT WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 y WO 88/09344. En el bicatenario, las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera están unidas por un enlace no covalente, y en el Fv monocatenario, las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera están generalmente unidas por un enlace covalente a través de un enlazador peptídico o unidas directamente entre sí en el extremo C, formando un dímero como el Fv bicatenario. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse usando enzimas proteolíticas (por ejemplo, un anticuerpo completo se digiere con papaína para producir fragmentos Fab, y el tratamiento con pepsina da como resultado la producción de fragmentos  $F(ab')_2$ ), y se pueden preparar mediante técnicas de recombinación genética.

De acuerdo con una realización, el anticuerpo de esta invención incluye anticuerpos Fab y anticuerpos completos. Además, la región constante de cadena pesada se selecciona de los isotipos que consisten en  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  o  $\epsilon$ . Preferentemente, la región constante de cadena pesada incluye los isotipos  $\gamma 1$ ,  $\gamma 3$  y  $\gamma 4$ , de la forma más preferente el isotipo  $\gamma 1$ . La región constante de cadena ligera puede ser el isotipo  $\kappa$  y  $\lambda$ , preferentemente, el isotipo  $\kappa$ . Por lo tanto, una realización preferible del presente anticuerpo es un anticuerpo Fab o IgG1 que comprende una cadena ligera  $\kappa$  y una cadena pesada  $\gamma 1$ .

La expresión "cadena pesada" usada en el presente documento se refiere tanto a una cadena pesada de longitud completa como a su parte, que incluye el dominio variable ( $V_H$ ) que contiene la secuencia de aminoácidos de una secuencia de región variable para unirse específicamente al antígeno y tres dominios constantes ( $CH_1$ ,  $CH_2$  y  $CH_3$ ). La expresión "cadena ligera" usada en el presente documento se refiere tanto a una cadena ligera de longitud completa como a su parte, que incluye el dominio variable ( $V_L$ ) que contiene la secuencia de aminoácidos de una secuencia de región variable para unirse específicamente al antígeno y un dominio constante ( $CL$ ).

La expresión usada en el presente documento "CDR (región determinante de complementariedad)" se refiere a una secuencia de aminoácidos de regiones hipervariables de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª edición, Departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos, Institutos Nacionales de Salud (1987)). Cada una de las cadenas pesada y ligera comprende tres CDR (cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3)). La CDR proporciona residuos de contacto que desempeñan un papel crucial en la unión del anticuerpo a un antígeno o epítopo.

En el anticuerpo divulgado, CDRH3 está representada por la fórmula 1.

En la fórmula 1,  $X_1$  representa His, Asn, Ser o Ala; específicamente His, Asn o Ser; más específicamente His o Asn; aún más específicamente His.

En la fórmula 1,  $X_2$  representa Leu, Phe, Tyr, His, Met, Trp, Asn, Ile o Ala; específicamente Leu, Phe, Tyr, His, Met, Trp, Asn o Ile; más específicamente Leu, Phe o Tyr; aún más específicamente Leu.

En la fórmula 1,  $X_3$  representa Gly o Cys; específicamente Gly.

En la fórmula 1,  $X_4$  representa Gly o Ser; específicamente Gly.

En la fórmula 1,  $X_5$  representa Thr, Met o Ala; específicamente Thr.

En la fórmula 1,  $X_6$  representa Ala, Ser, Gly o Thr; específicamente Ala.

En la fórmula 1,  $X_7$  representa Ser, Ala, Cys o Thr; específicamente Ser.

## ES 2 710 707 T3

De acuerdo con una divulgación, X<sub>1</sub> representa His, Asn o Ser; X<sub>2</sub> representa Leu, Phe o Tyr; X<sub>3</sub> representa Gly; X<sub>4</sub> representa Gly; X<sub>5</sub> representa Thr, Met o Ala; X<sub>6</sub> representa Ala, Ser, Gly o Thr; y X<sub>7</sub> representa Ser, Ala, Cys o Thr.

5 Más específicamente, X<sub>1</sub> representa His, Asn o Ser; X<sub>2</sub> representa Leu, Phe o Tyr; X<sub>3</sub> representa Gly; X<sub>4</sub> representa Gly; X<sub>5</sub> representa Thr; X<sub>6</sub> representa Ala; y X<sub>7</sub> representa Ser.

10 Aún más específicamente, CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO:3, 27-28, 32 y 39-86; aún mucho más específicamente, CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:3, 43, 64, 67, 71, 76, 83, 84 u 85; de la forma más específica, la SEQ ID NO:3.

10 De acuerdo con una divulgación, la región variable de cadena ligera comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 representada por la siguiente fórmula 2:

15 
$$Y_1-Y_2-Y_3-Y_4-Y_5-Y_6\text{-Pro-Trp-Thr} \quad (2)$$

en la que Y<sub>1</sub> representa Gln, Asp o Ala; Y<sub>2</sub> representa Gln, Asn, Glu o Ala; Y<sub>3</sub> representa Leu, Met, Asn, Ile, Ser, Thr, Ala o Lys; Y<sub>4</sub> representa Tyr, Ala, Ser, Arg, Val, Gli, Met o Phe; Y<sub>5</sub> representa Ser, Phe, Tyr, Arg, Ile, Gli, Lys, Asn, Val o Ala; y Y<sub>6</sub> representa Thr, Ser, Val, Ile, Ala, Gli, Asn, Glu, Phe o Leu.

20 En la fórmula 2, Y<sub>1</sub> representa Gln, Asp o Ala; específicamente Gln o Asp; más específicamente Gln.

En la fórmula 2, Y<sub>2</sub> representa Gln, Asn, Glu o Ala; específicamente Gln, Asn o Glu; más específicamente Gln.

25 En la fórmula 2, Y<sub>3</sub> representa Leu, Met, Asn, Ile, Ser, Thr, Ala o Lys; específicamente Leu, Met, Asn, Ile, Ser o Thr; más específicamente Leu, Met, Asn o Ile; aún más específicamente Leu o Met; de la forma más específica, Leu.

En la fórmula 2, Y<sub>4</sub> representa Tyr, Ala, Ser, Arg, Val, Gli, Met o Phe; específicamente Tyr o Ala.

30 En la fórmula 2, Y<sub>5</sub> representa Ser, Phe, Tyr, Arg, Ile, Gli, Lys, Asn, Val o Ala; específicamente Ser, Phe, Tyr, Arg o Ile; más específicamente Ser, Phe o Tyr.

En la fórmula 2, Y<sub>6</sub> representa Thr, Ser, Val, Ile, Ala, Gli, Asn, Glu, Phe o Leu; específicamente Thr, Ser, Val, Ile, Ala, Gly o Asn; más específicamente Thr, Ser o Ala.

35 De acuerdo con una divulgación, Y<sub>1</sub> representa Gln o Asp; Y<sub>2</sub> representa Gln; Y<sub>3</sub> representa Leu, Met, Asn, Ile, Ser o Thr; Y<sub>4</sub> representa Tyr, Ala, Ser, Arg, Val, Gli, Met o Phe; Y<sub>5</sub> representa Ser, Phe, Tyr, Arg o Ile; y Y<sub>6</sub> representa Thr, Ser, Val, Ile, Ala, Gly o Asn.

40 Más específicamente, CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:6, 33-38 u 87-245; aún más específicamente, CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:6, 88, 109, 131, 155, 156, 157, 178, 218, 220, 222 o 239; de la forma más específica, las SEQ ID NO:6, 88 (hz1E11-3), 218 (hz1E11-133) o 239 (hz1E11-154).

45 De acuerdo con una divulgación, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:8 (1E11) o 24 (hz1E11).

De acuerdo con una divulgación, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:10 (1E11), 26 (hz1E11), 247 (hz1E11-3), 249 (hz1E11-133) o 251 (hz1E11-154).

50 Como se demuestra en los ejemplos, mientras que el anticuerpo de la presente invención está unido específicamente al subdominio 4 entre los dominios extracelulares de HER2, el presente anticuerpo está unido a un epítipo en el subdominio 4 que es diferente de un epítipo de trastuzumab.

55 El anticuerpo contra HER2 divulgado o su fragmento de unión a antígeno incluye variantes de las secuencias de aminoácidos expuestas en la lista de secuencias adjunta, siempre que sean capaces de reconocer específicamente HER2. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos pueden alterarse para mejorar la afinidad de unión y/o las otras características biológicas de los anticuerpos. Por ejemplo, dichas alteraciones incluyen delección, inserción y/o sustitución de residuos de aminoácidos de anticuerpos.

60 Dichas variaciones de aminoácidos pueden proporcionarse basándose en una similitud relativa de cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo, hidrofobicidad, hidrofiliadad, carga y tamaño. Mediante el análisis de tamaño, forma y tipo de las cadenas laterales de aminoácidos, podría quedar claro que todos los residuos de arginina, lisina e histidina son aquellos que tienen carga positiva; alanina, glicina y serina tienen un tamaño similar; fenilalanina, triptófano y tirosina tienen una forma similar. Por consiguiente, basándose en estos factores considerables, arginina, lisina e histidina; alanina, glicina y serina; y fenilalanina, triptófano y tirosina pueden considerarse biológicamente equivalentes funcionales.

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

Para proporcionar una función biológica interactiva de las proteínas, el índice hidropático del aminoácido es muy importante. Es bien conocido por un experto en la materia que las variantes pueden poseer una actividad biológica similar solo cuando las proteínas se reemplazan con aminoácidos que tienen un índice hidropático similar. Cuando se introducen variaciones basadas en el índice hidropático, la sustitución se realiza preferentemente entre residuos de aminoácidos que tienen no más de  $\pm 2$  de diferencia en los valores del índice hidropático, más preferentemente dentro de  $\pm 1$ , mucho más preferentemente dentro de  $\pm 0,5$ .

También sería obvio para los expertos en la materia que las sustituciones de aminoácidos con otros aminoácidos que tienen valores de hidrofiliidad similares pueden dar como resultado la generación de variantes que tienen actividades biológicamente equivalentes. Como se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 4.554.101, a cada residuo de aminoácido se le asignan los siguientes valores de hidrofiliidad: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 $\pm$ 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

Cuando se pretende que las variaciones se introduzcan en función del valor de hidrofiliidad, la sustitución se realiza preferentemente entre residuos de aminoácidos que tienen no más de  $\pm 2$  de diferencia en los valores de hidrofiliidad, más preferentemente dentro de  $\pm 1$ , mucho más preferentemente dentro de  $\pm 0,5$ .

La alteración de residuos de aminoácidos sin alterar sustancialmente la actividad de la proteína es bien conocida por un experto en la materia (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York, 1979). Dicha alteración de aminoácidos incluye sustituciones de Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, pero sin limitarse a las mismas.

Considerando las variaciones mencionadas anteriormente que tienen actividades biológicamente equivalentes, podría entenderse que el anticuerpo o el ácido nucleico que lo codifica incluye secuencias sustancialmente idénticas a las secuencias expuestas en la lista de secuencias adjunta. Las secuencias sustancialmente idénticas se refieren a aquellas que muestran preferentemente al menos el 61 %, más preferentemente al menos del 70 %, aún más preferentemente al menos el 80 %, de la forma más preferente al menos el 90 % de similitud de nucleótidos con las secuencias de la lista de secuencias adjunta, según se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias usados convencionalmente. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Se describen diversos programas y algoritmos de alineación en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman y Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson y Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins y Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang *et al.*, *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992); y Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31 (1994)). La Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10 (1990)) está disponible a partir de varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional de Información Biológica (NCBI, Bethesda, Md.) y en Internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencias para blastp, blastm, blastx, blastn y tblastx. Se puede acceder en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa está disponible en [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast\\_help.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html).

El anticuerpo de la presente invención incluye, pero sin limitación, anticuerpo monoclonal, anticuerpo multiespecífico, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico, Fv monocatenarios (scFV), anticuerpo monocatenario, fragmento Fab, fragmento F(ab'), anticuerpo Fv unido a disulfuro (sdFV) y anti-idiotipo (anti-Id), y un fragmento de unión a epítipo del mismo.

Las secuencias de CDR de los presentes anticuerpos exhiben una baja similitud con las secuencias de CDR de anticuerpos conocidos públicamente, lo que refiere que las secuencias de CDR son únicas. Por ejemplo, los anticuerpos divulgados en las patentes de Estados Unidos n.º. 7.329.737 y 7.993.646 que tienen la mayor similitud con los anticuerpos presentes en la búsqueda de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) muestran una similitud de menos del 50 % con las secuencias de CDR del anticuerpo 1E11, un anticuerpo originales, y además están unidos a hK-1 que es diferente de la diana de los presentes anticuerpos.

Por consiguiente, las secuencias de aminoácidos de los presentes anticuerpos pueden considerarse novedosas y únicas.

Se divulga una molécula de ácido nucleico que codifica el presente anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

La expresión usada en el presente documento "molécula de ácido nucleico" se refiere de manera exhaustiva a una molécula de ADN (ADNg y ADNc) o ARN, y los nucleótidos básicos de la molécula de ácido nucleico también incluyen análogos con azúcar o base modificada, así como nucleótidos naturales (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, Nueva York (1980); Uhlman y Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584 (1990)). La secuencia de la molécula de ácido nucleico divulgada que codifica las regiones variables de cadena pesada y ligera podría modificarse. Dicha modificación incluye adición, delección o sustitución no conservativa o conservativa del nucleótido.

De acuerdo con una divulgación, la molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:7 o 23.

De acuerdo con una divulgación, la molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:9, 25, 246, 248 o 250.

La molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo contra HER2 divulgado también incluye una secuencia de nucleótidos que comparte una homología sustancial con la secuencia de nucleótidos anterior. La homología sustancial significa la secuencia de nucleótidos que comparte una homología de al menos el 80 %, más preferentemente el 90 % y de la forma más preferente el 95 % mediante el análisis de alineación de secuencias usando la alineación máxima entre la secuencia de nucleótidos divulgada y otras secuencias aleatorias y algoritmos conocidos habitualmente por los expertos en la materia.

Se divulga un vector recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente.

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

De acuerdo con una divulgación, las moléculas de ácido nucleico que codifican las regiones variables de cadenas ligera y pesada están unidas operativamente a un promotor.

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

Los vectores recombinantes divulgados pueden construirse mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la materia y sus métodos prácticos se describen en Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).

Típicamente, el vector divulgado puede construirse como vector de clonación o de expresión. Además, el vector puede construirse usando una célula procariota o eucariota como célula huésped.

Por ejemplo, cuando el vector de expresión se construye para la célula huésped eucariota, puede usarse un promotor derivado del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína, promotor de  $\beta$ -actina, promotor de hemoglobina humana y promotor de creatina de músculo humano) o virus de mamífero (por ejemplo, promotor tardío de adenovirus; promotor 7.5K del virus vaccinia, promotor de SV40, promotor de citomegalovirus, promotor tk del VHS, promotor del virus del tumor mamario de ratón (VTMR), promotor LTR de VIH, promotor del virus Moloney, promotor del virus Epstein-Barr (VEB) y promotor del virus del sarcoma de Rous (VSR)). El vector generalmente contiene una secuencia de poliadenilación como terminador de la transcripción.

El vector divulgado puede fusionarse con otras secuencias para purificar un anticuerpo expresado. Por ejemplo, una secuencia a fusionar incluye glutatión-S-transferasa (Pharmacia, EE. UU.), proteína de unión a maltosa (NEB, EE. UU.), FLAG (IBI, EE. UU.) y 6x His (hexahistidina; Quiagen, EE. UU.) y así sucesivamente.

Dado que la proteína expresada por el vector divulgado es un anticuerpo, el anticuerpo expresado también podría purificarse en toda la columna de proteína A de una manera fácil sin secuencias aditivas para la purificación.

El vector de expresión divulgado incluye un gen de resistencia a antibióticos conocido por los expertos en la materia como un marcador de selección, por ejemplo genes resistentes contra ampicilina, gentamicina, carbenicilina, cloranfenicol, estreptomina, kanamicina, geneticina, neomicina y tetraciclina.

Se divulga una célula huésped transformada con el vector recombinante descrito anteriormente.

Las células huésped en las que el vector divulgado se clona y se expresa de forma estable y sucesiva, también utilizan cualquiera conocida por los expertos en la materia, por ejemplo, célula huésped eucariota adecuada que incluye células COS7 (células de riñón de mono), célula NSO, SP2/0, célula CHO (ovario de hámster chino), W138,



célula BHK (riñón de cría de hámster), MDCK, línea celular de mieloma, célula HuT 78 y célula HEK-293, pero sin limitarse a las mismas.

5 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar un cáncer, que comprende: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo contra HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Dado que la presente composición farmacéutica comprende el anticuerpo contra HER2 de la presente invención o su fragmento de unión a antígeno como principio activo, las descripciones comunes entre ellos se omiten para evitar redundancias indebidas que conducen a la complejidad de esta memoria descriptiva.

15 Como se aborda en los ejemplos, el anticuerpo contra HER2 de la presente invención en combinación con trastuzumab destruye las células cancerosas (particularmente, células de cáncer de mama, más particularmente, células de cáncer de mama que expresan HER2) con una citotoxicidad significativamente mejorada y, por lo tanto, muy eficaz en la terapia del cáncer (particularmente, cáncer de mama y cáncer de estómago, más particularmente, cáncer de mama y cáncer de estómago que expresan HER2). De acuerdo con una realización, la composición farmacéutica comprende además trastuzumab.

20 El cáncer que a prevenir o tratar mediante la presente composición incluye diversos cánceres conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de bronquios, cáncer nasofaríngeo, cáncer de laringe, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer de hueso, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides o cáncer ureteral.

25 Específicamente, el cáncer a prevenir o tratar mediante la composición es cáncer que expresa HER2, más específicamente cáncer de mama o cáncer de estómago que expresa HER2.

30 En otro aspecto más de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para inducir apoptosis, que comprende: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo contra HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 De acuerdo con una realización, la composición farmacéutica induce apoptosis para la prevención o el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa; en la que la enfermedad hiperproliferativa es cáncer, hiperplasia, queloide, síndrome de Cushing, aldosteronismo primario, eritroplasia, policitemia vera, leucoplasia, cicatriz hiperplásica, liquen plano, lentiginosis, arteriosclerosis, aterosclerosis, reestenosis o estenosis.

40 El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser uno convencional para formulación, incluyendo lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, caucho cultivable, fosfato de potasio, arginato, gelatina, silicato de potasio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabes, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales, pero sin limitarse a los mismos. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede incluir además un lubricante, un humectante, un edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión y un conservante. Los detalles de los vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables adecuados se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª edición, 1995).

45 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede administrar por vía parenteral, por ejemplo, mediante por administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, local, nasal, pulmonar o rectal.

50 Una dosis adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo de los métodos de formulación farmacéutica, los métodos de administración, la edad del paciente, el peso corporal, el sexo, la gravedad de las enfermedades, la dieta, el momento de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la sensibilidad a la composición farmacéutica. Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente invención se administra con una dosis diaria de 0,0001-100 mg/kg (peso corporal). La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad adecuada para prevenir o tratar el cáncer.

60 De acuerdo con las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, la composición farmacéutica puede formularse con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, proporcionando finalmente varias formas que incluyen una forma de dosis unitaria y una forma de dosis múltiples. La formulación puede ser aceite o medio acuoso, resuspensión o emulsión, extracto, polvo, supositorio, gránulos, comprimido o cápsula y comprender además dispersante o estabilizante.

65 El anticuerpo de la presente invención puede usarse para diagnosticar trastornos, enfermedades o afecciones relacionados con la expresión de HER2.

En un aspecto adicional de esta invención, se proporciona un kit para su uso en el diagnóstico de un trastorno, enfermedad o afección relacionado con la expresión de HER2, que comprende el anticuerpo contra HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención.

5 El trastorno, enfermedad o afección relacionado con la expresión de HER2 es particularmente cáncer, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de bronquios, cáncer nasofaríngeo, cáncer de laringe, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer de hueso, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides o cáncer ureteral. Específicamente, El kit de diagnóstico para el  
10 uso de la presente invención se usa para diagnosticar cáncer que expresa HER2, más específicamente cáncer de mama o cáncer de estómago que expresa HER2.

El anticuerpo de la presente invención se puede usar para analizar la sensibilidad a un fármaco del presente anticuerpo en un paciente.

15 Se divulga un kit para analizar la sensibilidad a un fármaco que comprende el presente anticuerpo.

El kit de análisis divulgado se usa para evaluar la sensibilidad a un fármaco del presente anticuerpo en un paciente. Por ejemplo, cuando las células cancerosas obtenidas de un paciente se incuban con el anticuerpo de esta invención y se dilucida que el anticuerpo está unido a las células, se determina que el paciente posee una sensibilidad al fármaco del presente anticuerpo.

20 Dado que el kit divulgado comprende anticuerpos, puede fabricarse para inmunoensayo o inmunotinción. El formato de inmunoensayo o inmunotinción incluye, pero sin limitación, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), ELISA de captura, ensayo de inhibición o de competición, ensayo en sándwich, citometría de flujo, tinción por inmunofluorescencia y purificación por inmutofinidad, pero sin limitarse a los mismos. El inmunoensayo o los procedimientos de inmunotinción se pueden encontrar en *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*, en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; y Ed Harlow y David Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

30 Por ejemplo, de acuerdo con el método de radioinmunoensayo, el anticuerpo etiquetado con radioisótopo (por ejemplo, C<sup>14</sup>, I<sup>125</sup>, P<sup>32</sup> y S<sup>35</sup>) se puede usar para identificar HER2 en la superficie de las células cancerosas. De acuerdo con el método ELISA, el método de ejemplo específico puede comprender las etapas de: (i) recubrir una superficie de un sustrato sólido con una muestra biológica a analizar; (ii) incubar la muestra biológica con el anticuerpo contra HER2 de esta invención como un anticuerpo primario; (iii) incubar el resultante de la etapa (ii) con un anticuerpo secundario conjugado con una enzima; y (iv) medir la actividad de la enzima.

40 El sustrato sólido puede ser polímeros de hidrocarburo (por ejemplo, poliestireno y polipropileno), vidrio, metales o geles. De la forma más preferente, el sustrato sólido es una placa de microtitulación.

45 La enzima conjugada con el anticuerpo secundario incluye una enzima que cataliza reacciones colorimétricas, fluorométricas, de luminiscencia o infrarrojas, por ejemplo fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, luciferasa y citocromo P<sub>450</sub>. Cuando se usa fosfatasa alcalina, bromocloroindolfosfato (BCIP), nitroazul de tetrazolio (NBT), naftol-AS-BI-fosfato y ECF (quimifluorescencia mejorada) se pueden usar como sustrato; en el caso de usar peroxidasa de rábano picante, clonaftol, aminoetilcarbazol, diaminobencidina, D-luciferina, lucigenina (nitrate de bis-*N*-metilacridinio), éter bencílico de resorufina, luminol, reactivo Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina, Pierce), HYR (p-fenilendiamina-HCl y pirocatecol), TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), ABTS (2,2'-azino-di[sulfonato de 3-etilbenzotiazolina]), o-fenilendiamina (OPD) y naftol/pironina, glucosa oxidasa y t-NBT (nitroazul de tetrazolio) y *m*-PMS (metosulfato de fenazina) se pueden usar como un sustrato.

50 De acuerdo con el método ELISA de captura, el método específico puede comprender las etapas de: (i) recubrir una superficie de un sustrato sólido con el anticuerpo contra HER2 como un anticuerpo de captura; (ii) incubar el anticuerpo de captura con una muestra biológica a analizar; (iii) incubar el resultante de la etapa (ii) con el anticuerpo contra HER2 conjugado con una etiqueta que genera una señal detectable como un anticuerpo de detección; y (iv) medir la señal generada a partir de la etiqueta.

60 El anticuerpo de detección tiene una etiqueta que genera una señal detectable. La etiqueta incluye, pero sin limitación, una etiqueta química (por ejemplo, biotina), una enzimática (por ejemplo, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante y citocromo P<sub>450</sub>), una radiactiva (por ejemplo, C<sup>14</sup>, I<sup>125</sup>, P<sup>32</sup> y S<sup>35</sup>), una fluorescente (por ejemplo, fluoresceína), una luminiscente, una quimioluminiscente y una FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia). Se pueden encontrar diversas etiquetas y métodos para etiquetar anticuerpos en Ed Harlow y David Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

65

La medición de la actividad o señal de la enzima en ELISA y ELISA de captura se puede llevar a cabo mediante diversos procesos bien conocidos en la técnica. Cuando se usa biotina como etiquetas, la detección se puede realizar usando estreptavidina. Cuando se usa luciferasa, la detección se puede realizar usando luciferina.

5 La muestra biológica aplicable al presente kit incluye, pero sin limitación, células, tejidos, extractos derivados de tejidos, lisado o producto purificado, sangre, plasma, suero, linfa y líquido ascítico.

10 El anticuerpo de la presente invención se puede usar para formar imágenes *in vivo* o *in vitro*. Se divulga una composición de formación de imágenes que comprende el anticuerpo de la presente invención y una etiqueta generadora de señales conjugada al anticuerpo.

15 La etiqueta que genera señales incluye, pero sin limitación, agente de contraste T1 (por ejemplo, compuesto de quelato de Gd), agente de contraste T2 (por ejemplo, materiales superparamagnéticos (por ejemplo, magnetita, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ferrita de manganeso, ferrita de cobalto y ferrita de níquel)), radioisótopo (por ejemplo, <sup>11</sup>C, <sup>15</sup>O, <sup>13</sup>N, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>44</sup>Sc, <sup>45</sup>Ti, <sup>118</sup>I, <sup>136</sup>La, <sup>198</sup>Tl, <sup>200</sup>Tl, <sup>205</sup>Bi y <sup>206</sup>Bi), materiales fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, ficoeritrina, rodamina, lisamina, Cy3 y Cy5), materiales quimioluminiscentes, partículas magnéticas, etiquetas de masa y partículas densas a electrones.

20 Aunque el anticuerpo de la presente invención solo es útil en terapia del cáncer, puede proporcionarse en forma de ADC (conjugado de anticuerpo y fármaco) mediante la conjugación con otro fármaco porque el anticuerpo es capaz de dirigirse a las células que expresan HER2.

25 Se divulga un ADC (conjugado de anticuerpo y fármaco) que comprende el anticuerpo de la presente invención y un fármaco conjugado con el anticuerpo.

30 El fármaco conjugado con el anticuerpo incluye, pero sin limitación, sustancias químicas, radionúclidos, agentes inmunoterapéuticos, citocinas, quimioquinas, toxinas, agentes biológicos e inhibidores de enzimas, específicamente los siguientes medicamentos antineoplásicos: acivicina, aclarubicina, acodazol, acronicina, adozelesina, alanosina, aldesleucina, alopurinol sódico, altretamina, aminoglutetimida, amonafida, ampligen, amsacrina, andrógenos, anguidina, glicinato de afidicolina, asaley, asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bacilo de Calmette-Guerin (BCG), Antifol de Baker, beta-2'-desoxitioguanosina, bisantreno HCl, sulfato de bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, BWA773U82, BW 502U83/HCl, mesilato de BW 7U85, ceracemida, carbetímero, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cloroquinaxalina-sulfonamida, clorozotocina, cromomicina A3, cisplatino, cladribina, corticoesteroides, Corynebacterium parvum, CPT-11, crisnatol, ciclocitidina, ciclofosfamida, citarabina, citembená, maleato de DABIS, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina HCl, desazauridina, dexrazoxano, dianhidrogalaclitol, diazicuona, dibromodulcitol, didemnina B, dietilditiocarbamato, diglucoaldehído, dihidro-5-azacitidina, doxorubicina, equinomicina, dedatrexato, edelfosina, eflornitina, solución de Elliott, elsamitrucina, epirubicina, esorrubicina, fosfato de estramustina, estrógenos, etanidazol, etiofos, etopósido, fadrazol, fazarabina, fenretinida, filgrastim, finasterida, ácido flavona-acético, floxuridina, fosfato de fludarabina, 5-fluorouracilo, Fluosol™, flutamida, nitrato de galio, gemcitabina, acetato de goserelina, hepsulfam, hexametilbisacetamida, homoharringtonina, sulfato de hidrazina, 4-hidroxiandrostenediona, hidroxurea, idarubicina HCl, ifosfamida, 4-ipomeanol, iproplatino, isotretinoína, leucovorina cálcica, acetato de leuprólido, levamisol, daunorubicina liposómica, doxorubicina encapsulada en liposoma, lomustina, lonidamina, maitansina, clorhidrato de mecloretamina, melfalán, menogaril, merbarona, 6-mercaptapurina, mesna, residuo de extracción con metanol de bacilo de Calmette-Guerin, metotrexato, N-metilformamida, mifepristona, mitoguazona, mitomicina-C, mitotano, mitoxantrona clorhidrato, factor estimulante de colonias de monocitos/macrófagos, nabilona, nafoxidina, neocarzinostatina, acetato de octreotida, ormaplatino, oxaliplatino, paclitaxel, pala, pentostatina, piperazindiona, pipobromano, pirarubicina, piritrexim, clorhidrato de piroxantrona, PIXY-321, plicamicina, porfímero sódico, prednimustina, procarbazona, progestinas, pirazofurina, razoxano, sargramostim, semustina, espirogermanio, espiromustina, estreptonigrina, estreptozocina, sulofenur, suramin sodio, tamoxifeno, taxotere, tegafur, tenipósido, tereftalamidina, teroxirona, tioguanina, tiotepa, inyección de timidina, tiazofurina, topotecán, toremifeno, tretinoína, clorhidrato de trifluoperazina, trifluridina, trimetrexato, TNF (factor de necrosis tumoral), mostaza de uracilo, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina, vinorelbina, vinzolidina, Yoshi 864, zorubicina, arabinósido de citosina, etopósido, melfalán, taxotere y taxol.

55 Efectos de esta invención

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

60 (a) El anticuerpo de la invención se une específicamente a HER2 sobreexpresado en células cancerosas (particularmente, células de cáncer de mama y de cáncer de estómago), específicamente a un epítipo en HER2 que es diferente del epítipo para trastuzumab.

(b) Las secuencias de CDR de los presentes anticuerpos exhiben una baja similitud con las secuencias de CDR de los anticuerpos contra HER2 conocidos públicamente, lo que refiere que las secuencias de CDR son únicas.

65 (c) Los anticuerpos de la presente invención en combinación con trastuzumab destruyen las células cancerosas con una citotoxicidad significativamente mejorada y, por lo tanto, son muy eficaces en el tratamiento del cáncer (en particular, el cáncer de mama y el cáncer de estómago).

(d) Sin pretender quedar ligados a ninguna teoría, las eficacias mejoradas de la terapia combinada abordarían el hecho de que los anticuerpos de la presente invención se unen al epítipo en HER2 que es diferente del epítipo para trastuzumab, e inhiben HER2 de manera cooperativa con trastuzumab.

5 (e) Los anticuerpos de la presente invención capaces de inducir apoptosis pueden usarse para la prevención o el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas.

(f) La presente invención también puede ser útil en el diagnóstico del cáncer, el análisis de la sensibilidad al fármaco, la formación de imágenes y el ADC (conjugado anticuerpo y fármaco), así como en la terapia del cáncer.

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra mapas genéticos del vector pcDNA3.3-IgG Heavy y del vector pOptiVEC-IgG Kappa.

15 Las figuras 2A y 2B son gráficos que muestran, respectivamente, los efectos inhibidores de la proliferación de un tratamiento único con el anticuerpo 1E11 y un tratamiento combinado de anticuerpo 1E11 y trastuzumab contra la línea celular cancerosa NCI-N87 y la línea celular cancerosa BT-474. TRA, PER y hIgG indican respectivamente trastuzumab, pertuzumab e IgG humana (control negativo).

Las figuras 3A y 3B muestran que el anticuerpo 1E11 se une a un dominio del subdominio de HER2 que es diferente del dominio de unión de trastuzumab'. Las figuras 3A y 3B muestran, respectivamente, los resultados del análisis SPR y el análisis ELISA.

20 La figura 4A muestra el resultado del análisis ELISA para examinar si el anticuerpo 1E11 se une específicamente a HER2 entre las proteínas de la familia ErbB a las que pertenece HER2. Cetuximab (CET) se usó como un anticuerpo de control contra la proteína EGFR.

La figura 4B muestra el resultado del análisis ELISA para examinar si el anticuerpo 1E11 se une a HER2 diferente del de seres humanos.

25 La figura 5A muestra el resultado del análisis del porcentaje de células cancerosas en las que se produjo apoptosis cuando las células NCI-N87 se trataron con anticuerpo 1E11 o trastuzumab solos o en combinación de los mismos.

La figura 5B muestra el resultado del análisis del porcentaje de células cancerosas en las que se produjo apoptosis cuando las células BT-474 se trataron con anticuerpo 1E11 o trastuzumab solos o en combinación de los mismos.

30 La figura 5C muestra el resultado de los análisis de viabilidad celular 24 horas y 48 horas después de tratar las células NCI-N87 con anticuerpo 1E11 o trastuzumab solos o en combinación de los mismos. El grupo de control muestra la viabilidad de las células tratadas solo con PBS, el disolvente para los anticuerpos.

35 La figura 5D muestra el resultado del análisis de la actividad de caspasa-3/7, 24 horas después de tratar las células NCI-N87 con anticuerpo 1E11 o trastuzumab solos o en combinación de los mismos. El grupo de control muestra la viabilidad de las células tratadas solo con PBS, el disolvente para los anticuerpos.

La figura 6A muestra el resultado del análisis de transferencia de Western que ilustra la disminución en la señalización de HER2 cadena abajo mediante el tratamiento con el anticuerpo 1E11 o trastuzumab solos o en combinación de los mismos.

40 La figura 6B es un gráfico que muestra el efecto inhibidor de la proliferación celular inducido por la heterodimerización mediante el tratamiento con el anticuerpo 1E11 o trastuzumab solos o en combinación de los mismos. Un control negativo (Ctrl negativo) muestra la viabilidad de las células no tratadas con ligandos ni anticuerpos, y un control positivo (Ctrl positivo) muestra la viabilidad de las células tratadas con solo ligandos sin tratamiento con anticuerpos.

45 Las figuras 7A a 7C muestran los efectos inhibidores del crecimiento de células tumorales en un modelo animal de xenoinjerto de NCI-N87 mediante el tratamiento con anticuerpo 1E11 o trastuzumab solos o en combinación de los mismos. La figura 7A muestra un gráfico que ilustra el cambio en el volumen del tumor, la figura 7B muestra un gráfico que ilustra el cambio en el peso del tumor y la figura 7C muestra una imagen que ilustra el resultado de la tinción de los tejidos tumorales. El Ab de control es palivizumab.

50 Las figuras 8A y 8B son gráficos que muestran, respectivamente, los efectos inhibidores de la proliferación de la línea celular cancerosa NCI-N87 y la línea celular cancerosa OE-19, mediante un tratamiento individual con el anticuerpo hz1E11, que es un anticuerpo humanizado, y un tratamiento combinado del anticuerpo hz1E11 y trastuzumab.

55 La figura 9 muestra el efecto inhibidor del crecimiento de células tumorales en un modelo animal de xenoinjerto de NCI-N87 mediante el tratamiento con anticuerpo hz1E11 o trastuzumab solos o en combinación de los mismos. El Ab de control es palivizumab.

60 Las figuras 10A y 10B, respectivamente, muestran los resultados de barrido de alanina de CDRH3 y CDRL3 del anticuerpo hz1E11. Las figuras 11A a 11F son gráficos que muestran los efectos inhibidores de la proliferación de las líneas celulares cancerosas NCI-N87, OE-19 y BT-474 mediante un tratamiento individual con los anticuerpos hz1E11-3, hz1E11-133 y hz1E11-154, que son anticuerpos humanizados de afinidad mejorada, y un tratamiento combinado de trastuzumab con ellos.

65 La presente invención se describirá a continuación con más detalle mediante ejemplos. Sería obvio para los expertos en la materia que se pretende que estos ejemplos sean más concretamente ilustrativos y que el alcance de la presente invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas no esté limitado a o por los ejemplos.

**Ejemplos****EJEMPLO 1: DESARROLLO DE ANTICUERPOS CONTRA HER2**

5 Para preparar anticuerpos, el dominio extracelular (ECD) de la proteína HER2 se produjo usando células animales y a continuación se usó como un antígeno. El ADN, donde una región bisagra de IgG1 humana y la parte Fc (CH2-CH3) se unieron al extremo C de ECD, se clonó usando las enzimas de restricción HindIII y BamHI. Después, el vector clonado se transfectó transitoriamente en la célula FreeStyle™ 293F (Invitrogen, No. de cat. R790-07) usando polietilenimina (Polyscience Inc., No. de cat. 23966) y se purificó la proteína de fusión HER2-ECD Fc a partir del cultivo celular usando la resina Protein-A Ceramic HyperD F (PALL, no. de cat. 20078-028). La proteína purificada se cuantificó usando un colorante de ensayo de proteínas (Bio-Rad, No. de cat. 500-0006), se sometió a SDS-PAGE y su concentración y pureza se confirmaron mediante tinción de Coomassie. Se mezclaron 100 µg del antígeno proteico purificado con adyuvante de Freund (Sigma, No. de Cat. F5506) y a continuación se inyectaron por vía intraperitoneal en ratones BALB/c (DBL Co., Ltd., Corea). En dos semanas, se diluyeron 100 µg del antígeno en PBS y se inyectaron nuevamente, y tres días después, se extrajo el bazo del ratón y se aislaron linfocitos a partir del mismo. Los linfocitos aislados se mezclaron con la línea celular de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC, No. de cat. CRL-1581) en una proporción de 5:1 y se fusionaron con PEG-1500 (Roche, No. de cat. 783641). Las células fusionadas se cultivaron en un medio que contenía el suplemento de HAT (Sigma, No. de cat. H0262), y las células fusionadas (hibridoma) se seleccionaron y cultivaron selectivamente.

20 Las células de hibridoma obtenidas de este modo se examinaron mediante un ensayo ELISA para determinar si eran las células productoras de anticuerpos que se unen a antígenos. HER2-ECD-Fc o IgG humana ChromPure (hlgG, Jackson ImmunoResearch Lab. Inc., No. de cat. 009-000-003) se inmovilizó a temperatura ambiente en una placa Costar de 96 pocillos (Corning, No. de cat. 3590) a una concentración de 1 µg/ml durante 1 hora. El resultante se lavó 3 veces con TBS-T (Triton X-100 al 0,05 %) y a continuación se bloqueó a temperatura ambiente con 300 µl de TBS-T/SM (leche desnatada al 2 %) durante 30 minutos. La placa bloqueada se lavó 3 veces y se le añadió un caldo de cultivo de hibridoma, y se dejó unir a anticuerpos a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar el resultante 3 veces, se diluyó IgG-HRP anti-ratón (Pierce, No. de cat. 31439) como un anticuerpo secundario en TBS-T/SM en una proporción de 1:5.000 y se dejó que se uniera al mismo a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar el resultante 3 veces, se añadió TMB (SurModics, No. de cat. TMBC-1000-01) y se dejó desarrollar un color a temperatura ambiente durante 5 minutos y se le añadió ácido sulfúrico 1 N (DukSan, No. de cat. 254) para detener el desarrollo del color. La absorbancia se midió a 450 nm usando Victor X3 (PerkinElmer, No. de cat. 2030-0030), y se seleccionaron los anticuerpos que se unen específicamente a HER2-ECD-Fc.

35 Dado que HER2 es una proteína expresada en la superficie celular, se examinó si los anticuerpos desarrollados estaban unidos a células que sobreexpresaban HER2 mediante un ensayo ELISA basado en células. La línea celular de cáncer de ovario que sobreexpresa HER2, SKOV-3 (Korean Cell Line Bank (KCLB), No. de cat. 30077) se dividió en partes alícuotas en la placa Costar de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, No. de cat. 3595) a una concentración de 10.000 células/pocillo y se cultivaron durante 24 horas. Al día siguiente, después de retirar el sobrenadante del cultivo celular, el resultante se lavó con PBS 3 veces, se le añadió con caldo de cultivo de hibridoma y se cultivó adicionalmente a 37 °C durante 2 horas. Después de lavar el resultante 3 veces con TBS-T, IgG-HRP anti-ratón de cabra como anticuerpo secundario que se diluyó en PBS/FBS (FBS al 3 %) en una proporción de 1:5.000, se le añadió y se trató a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar el resultante 3 veces con TBS-T, se dejó desarrollar un color usando TMB. Se seleccionaron 61 clones que muestran una absorbancia más alta que la del cultivo celular SP2/0 como control negativo.

**EJEMPLO 2: COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS INHIBIDORES DE ANTICUERPOS DESARROLLADOS CONTRA EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA**

50 Con el fin de realizar un ensayo de viabilidad celular para confirmar el efecto inhibidor contra la proliferación de células de cáncer de mama, se purificaron los anticuerpos a partir del caldo de cultivo de hibridoma. El hibridoma se cultivó en un medio de cultivo que contenía FBS al 3 %, y los anticuerpos en forma de IgG se purificaron usando resina Protein-A. Los anticuerpos purificados se cuantificaron mediante un ensayo de BCA (Pierce, No. de cat. 23227), se sometieron a SDS-PAGE, y su concentración y pureza se confirmaron mediante tinción con Coomassie.

55 El ensayo de viabilidad celular se realizó mediante un tratamiento individual o un tratamiento combinado junto con trastuzumab con respecto a BT-474, la línea celular representativa de cáncer de mama, y la línea celular NCI-N87, la línea celular representativa de cáncer de estómago, donde se sobreexpresa HER2. Para el tratamiento combinado, se usó una mezcla de los anticuerpos desarrollados y trastuzumab mezclados en una proporción 1:1 (proporción en peso). Para la placa de 96 pocillos se dividieron en alícuotas BT-474 (ATCC, No. de cat. HTB-20, 10.000 células/pocillo) y NCI-N87 (ATCC, No. de cat. CRL-5822, 10.000 células/pocillo), y se cultivaron durante 24 horas. Los anticuerpos purificados se trataron, respectivamente, para tener una concentración de 5 µg/ml, y las líneas celulares BT-474 y NCI-N87 se cultivaron adicionalmente durante 4 días. Para el ensayo de viabilidad celular, se añadió CCK-8 (Dojindo, No. de cat. CK-04-13) a una concentración final del 10 %, se trató a 37 °C durante 3 horas y se midió su absorbancia. La viabilidad relativa se calculó con respecto a la absorbancia del pocillo no tratado con el

anticuerpo, que se estableció en el 100 % de la viabilidad. Basándose en lo anterior, se seleccionó el anticuerpo 1E11.

### EJEMPLO 3: ANALISIS DE LA SECUENCIA DE ANTICUERPOS

5 Para el ensayo de la secuencia de anticuerpos, se construyó una biblioteca de anticuerpos Fab de fago usando el ARN de hibridoma respectivo, y se procedió a una selección por adsorción de tres etapas para obtener un fago que se une al HER2-ECD-Fc (Phage display: a laboratory manual, Carlos Barbas III, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press). Después de cultivar el hibridoma, se aisló el ARN usando el sistema SV Total RNA Isolation System (Promega, No. de cat. Z3100) y se sintetizó un ADNc a partir del mismo. Usando un conjunto de cebadores conocido (véase: Phage display: a laboratory manual, Carlos Barbas III, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press), la región variable del anticuerpo se amplificó y se clonó en el vector pComb3X (Barbas laboratory, The Scripps Research Institute) usando la enzima de restricción Sfil después de ligar a Ck y CH1 humanas, y a continuación se transformó en bacterias ER2537 (New England Biolabs, No. de cat. 801-N). Las bacterias transformadas se transfectoron con el fago auxiliar VCSM13 (Stratagene, No. de cat. 200251) para obtener un fago, y se adquirió un clon que se une a HER2-ECD-Fc usando un inmunotubo, al que se inmovilizó HER2-ECD-Fc.

Entre las colonias para cada uno de los anticuerpos, los anticuerpos que se unen a HER2-ECD-Fc se confirmaron mediante un ensayo ELISA. Las colonias de las bacterias transformadas se cultivaron a 37 °C hasta que su absorbancia a 600 nm alcanzó 0,5, y se trataron con IPTG a una concentración final de 1 mM, se dejaron y expresaron anticuerpos en forma de Fab mientras se cultivaban durante una noche a 30 °C. Después de cultivar 5 ml, las células se recogieron por centrifugación, se suspendieron en 0,4 ml de 1X TES (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, sacarosa al 20 % (v/v), pH 8,0) y se trataron a 4 °C durante 10 minutos. Después de añadirle 0,6 ml de 0,2X TES, el resultante se trató a 4 °C durante 30 minutos, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Después de lavar la placa Costar de media área de 96 pocillos (Corning Inc., No. de cat. 3690), que se recubrió con HER2-ECD-Fc a una concentración de 1 µg/ml, 3 veces con TBS-T, se bloqueó con TBS-T/SM (leche desnatada sin grasa al 3 %, Triton X-100 al 0,05 %) a temperatura ambiente durante 1 hora. El caldo de cultivo o el extracto periplásmico (periplasma) para cada colonia se trató diluyéndolo a una proporción de 1:3 usando TBS-T/SM, y se dejó que se uniera a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar 3 veces, el anticuerpo anti-HA-HRP (Roche, No. de cat. 120-138-190-01) como anticuerpo secundario se diluyó a una proporción de 1:5000, se le dejó unir a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavó 3 veces, y se le permitió desarrollar un color usando TMB.

La mayoría de las colonias en el caldo de cultivo celular o el extracto periplásmico tenían una absorbancia de 0.2 o superior, y las secuencias de los anticuerpos se analizaron con respecto a estos clones. El análisis de secuencia reveló que las colonias derivadas de un solo hibridoma mostraron tener las mismas secuencias. Las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo 1E11 se resumen en la tabla 1 a continuación.

TABLA 1

| Secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo 1E11 |               |                  |
|---|---------------|------------------|
|   | Cadena ligera | Cadena pesada    |
| CDR1  | LASQTIGTWLA   | SYTMS            |
| CDR2  | ATSLAD        | YISNGGGSTYYPTVKG |
| CDR3  | QQLYSTPWT     | HLGGTASFDY       |

### EJEMPLO 4: CONSTRUCCIÓN Y PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS QUIMÉRICOS

Los anticuerpos quiméricos se construyeron para preparar los anticuerpos de la presente invención en una forma más farmacológicamente modulable.

La región variable de los anticuerpos de ratón, para la cual se completó el análisis de la secuencia de nucleótidos, se amplificó y se unió a las regiones constantes humanas Ck y CH, y la parte de la cadena pesada se sometió a clonación TA mediante vector pcDNA3.3-TOPO (Invitrogen, No. de cat., K8300-01), mientras que la parte de la cadena ligera se sometió a clonación TA mediante el vector pOptiVEC-TOPO (Invitrogen, No. de cat., 12744-017). Los cebadores usados para la amplificación se muestran en las tablas 2 y 3 a continuación. Los cebadores directos se insertaron con un sitio de restricción de ClaI, mientras que los cebadores inversos se añadieron con el sitio de restricción de NheI para la cadena pesada y el sitio de restricción de BsiWI para la cadena ligera, respectivamente. Adicionalmente, los cebadores directos en la región variable se añadieron con una secuencia señal para que los anticuerpos quiméricos pudieran secretarse en el caldo de cultivo celular. Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de Ck y CH usadas en la presente invención se describen en las SEQ ID NO: 11 a 14.

Se realizó repetidamente una reacción de PCR (30 segundos a 95 °C; 30 segundos a 58 °C y 30 segundos a 72 °C) durante 35 ciclos usando los cebadores y la ADN polimerasa GoTaq (Promega, No. de cat. M3005) descritos anteriormente. Cada uno de los productos de PCR amplificados de las regiones variables y las regiones constantes, después de someterse a una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, se purificó usando un kit de extracción en gel Qiaquick (QIAGEN, No. de cat. 28706). Con el fin de conectar las regiones variables y las regiones constantes, los productos de PCR de las regiones variables y las regiones constantes se mezclaron en una cantidad igual, y se realizó una PCR de extensión por solapamiento usando los cebadores directos para las regiones variables y los cebadores inversos para las regiones constantes para obtener productos génicos, y los productos se purificaron de la misma manera que se ha descrito anteriormente. La PCR de extensión por solapamiento (30 segundos a 95 °C; 30 segundos a 58 °C; y 45 segundos a 72 °C) se realizó repetidamente durante 35 ciclos usando los cebadores y se realizó usando la ADN polimerasa GoTaq (Promega, No. de cat. M3005). Los productos génicos amplificados se sometieron a clonación TA en el vector pcDNA3.3-TOPO (Invitrogen, No. de cat., K8300-01) para la parte de la cadena pesada, y se sometieron a clonación TA en el vector pOptiVEC-TOPO (Invitrogen, No. de cat., 12744-017) para la parte de la cadena ligera, de acuerdo con el manual del fabricante.

TABLA 2

| Cebadores para la amplificación de regiones variables |  |
|---|--|
| Cebadores   | Secuencia  |
| LF-1  | <u>CCGATCGATATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCT</u><br><u>GCTCTGGGTTCAGGTTCCACGTGGGATATTCAGATG</u> |
| LR-1  | CGGCGTACGTTTCAGCTCCAGCTTGG   |
| HF-1  | <u>CCGATCGATATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCT</u><br><u>GCTCTGGGTTCAGGTTCCACGTGGGAGGTGAAGCT</u>  |
| HR-1  | CGGGCTAGCTGAGGAGACGGTGAC   |

TABLA 3

| Cebadores para la amplificación de regiones constantes |   |
|--|---|
| Cebadores  | Secuencia                                   |
| Ck-F   | GGAGCTGAAACGT <b>ACGGT</b> GGCTGCACC        |
| Ck-R   | CCG <b>CTCGAG</b> TAACTCTCCCCTGTTG          |
| CH-F   | CACCGTCTCCTCAG <b>CTAGC</b> ACCAAGGGCCCATCG |
| CH-R   | CCG <b>CTCGAG</b> TCATTTACCCGGGGACAGGGAG    |

En las tablas anteriores, las letras en negrita indican los sitios de restricción para las enzimas de restricción, mientras que las partes subrayadas indican secuencias señal.

Los mapas del vector pcDNA3.3-IgG Heavy finalmente construido y del vector pOptiVEC-IgG Kappa se ilustran en la figura 1.

Después, los vectores clonados se transfectaron transitoriamente en células animales FreeStyle™ 293F (Invitrogen, No. de cat. R790-07) usando polietilenimina (Polyscience Inc., No. de cat. 23966) y se purificaron anticuerpos quiméricos a partir del caldo de cultivo celular usando la resina Protein-A Ceramic HyperD F (PALL, No. de cat. 20078-028). Los anticuerpos quiméricos purificados se cuantificaron mediante un ensayo de BCA (Pierce, No. de cat. 23227), se sometieron a SDS-PAGE, y su concentración y pureza se confirmaron mediante tinción con Coomassie.

**EJEMPLO 5: COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS INHIBIDORES DE ANTICUERPOS DESARROLLADOS CONTRA EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA Y CÁNCER DE ESTÓMAGO**

Con el fin de confirmar los efectos antineoplásicos de los anticuerpos desarrollados de acuerdo con su concentración, se realizó un ensayo de viabilidad celular con respecto a las líneas celulares cancerosas que sobreexpresan HER2, tales como, BT-474 (una línea celular de cáncer de mama) y NCI-N87 (una línea celular de cáncer de estómago). BT-474 (10.000 células/pocillo) y NCI-N87 (10.000 células/pocillo) a un volumen de 70 µl se dividieron en partes alícuotas en una placa de 96 pocillos y se inmovilizaron mientras se cultivaban durante 24 horas. Al día siguiente, se añadieron 30 µl de los anticuerpos a las células en cultivo. La concentración final de los

anticuerpos tratados fue de un máximo de 20 µg/ml por cada anticuerpo y se diluyó secuencialmente en una proporción de 1:4, y el ensayo se realizó a 5 concentraciones diferentes. Cuando se trató en combinación de trastuzumab, la proporción entre los anticuerpos desarrollados y el trastuzumab se estableció a una proporción de 1:1 (por ejemplo, en las figuras 2A y 2B, cuando la cantidad de administración fue de 1 µg/ml, se administraron 1 µg/ml TRA y 1 µg/ml de 1E11). Después del tratamiento con los anticuerpos, las células BT-474 y NCI-N87 se cultivaron durante 4 días adicionales, se les añadió CCK-8 a una concentración final del 10 % y se trataron a 37 °C durante 3 horas. Después, se midió la absorbancia de las células tratadas a 450 nm usando Victor X-3. La absorbancia de las células no tratadas con los anticuerpos se fijó al 100 % y se calculó su viabilidad relativa (figuras 2A y 2B).

El anticuerpo 1E11 desarrollado mostró un efecto inhibitorio contra la proliferación de las líneas celulares NCI-N87 (figura 2A) y BT-474 (figura 2B), que eran sensibles al trastuzumab. Además, el tratamiento combinado del anticuerpo 1E11 y trastuzumab mostró una mayor actividad inhibitoria contra la proliferación de células cancerosas que el tratamiento con trastuzumab solo, en relación con las líneas celulares NCI-N87 y BT-474. De forma interesante, el tratamiento combinado del anticuerpo 1E11 y trastuzumab mostró una mayor actividad inhibitoria contra la proliferación de células cancerosas que el tratamiento combinado de trastuzumab y pertuzumab, con respecto a la línea celular NCI-N87 (figura 2A).

**EJEMPLO 6: CONFIRMACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE ANTICUERPOS DESARROLLADOS EN EL TRATAMIENTO DE COMBINACIÓN CON TRASTUZUMAB**

Con el fin de confirmar si el efecto antineoplásico del tratamiento combinado del anticuerpo 1E11 desarrollado y trastuzumab en el cáncer de estómago fue sinérgico, las células NCI-N87 se trataron con el anticuerpo 1E11 o trastuzumab solos o en combinación de los mismos, se analizaron los efectos antineoplásicos (figura 2A). El efecto antineoplásico de acuerdo con la concentración se analizó a través del programa CalcuSyn (Biosoft) usando el método de Chou y Talalay (Chou et al., Adv. Enzyme. Regul. 22:27-55(1984)) que analiza el efecto de la administración combinada de al menos dos fármacos (tabla 4). Cuando se administran dos fármacos en combinación, se vuelven agonistas, aditivos o sinérgicos. Las interacciones mutuas de los fármacos se pueden analizar usando el método de Chou y Talalay en términos de índice de combinación (IC). El valor de IC de 1 o mayor indica un efecto agonista, mientras que los valores de IC de 1 y 1 o menos indican un efecto aditivo y un efecto sinérgico, respectivamente.

TABLA 4

| 1E11 + Trastuzumab |        |        |         |
|--------------------|--------|--------|---------|
| I.C.               |        |        | r       |
| DE50               | DE75   | DE90   |         |
| 0,0315             | 0,0459 | 0,0751 | 0,95921 |

En la tabla anterior, DE50, DE75 y DE90 indican las dosis efectivas, que muestran efectos en poblaciones del 50 %, 75 % y 90 %, respectivamente. 'r' indica un coeficiente de correlación lineal de un gráfico de mediana-efecto.

Como puede verse en la figura 2A y en la tabla 4, el valor de IC de los dos fármacos de trastuzumab y clones de 1E11 en el momento de su tratamiento combinado fue inferior a 0,1, y se confirmó que los dos anticuerpos tienen un efecto sinérgico cuando se administran en combinación.

**EJEMPLO 7: COMPARACIÓN DE EPÍTOPOS ENTRE LOS ANTICUERPOS DESARROLLADOS Y TRASTUZUMAB**

Se sabe que trastuzumab, el anticuerpo contra HER2, se une al dominio 4 entre los cuatro dominios del ECD de HER2. Con el fin de confirmar si los epítomos en HER2 de los anticuerpos desarrollados se superponen con los de trastuzumab, se realizó una pre-clasificación de epítomos mediante resonancia del plasmón superficial (SPR) usando Biacore 3000 (GE Healthcare). Aproximadamente 1.000 UR (unidad de respuesta) de trastuzumab se inmovilizaron en un chip sensor CM5 (GE Healthcare, No. de cat. BR-1000-12) a través de un método de acoplamiento de amina usando ECD/NHS. Se permitió que la proteína HER2-ECD-His a una concentración de 320 nM se uniera al chip sensor, al que se inmovilizó el trastuzumab, usando un tampón HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,005 %, pH 7,4) durante 4 minutos, y solo el tampón se dejó fluir durante 5 minutos para estabilizar la unión entre trastuzumab y HER2-ECD. Después, se dejó que los anticuerpos secundarios a una concentración de 1 µg/ml se les unieran durante 4 minutos, y se dejó que el tampón fluyera sobre ellos. En todos los experimentos, el caudal se estableció a 50 µl/min. Si los anticuerpos unidos de manera secundaria se unen adicionalmente a la proteína HER2-ECD, a la que se unió el trastuzumab, son anticuerpos que no comparten el epítomo común con trastuzumab.



Como puede verse en la figura 3A, hlgG, que se usó como un anticuerpo secundario, no se une a HER2 y, por lo tanto, no hubo una unión adicional, y dado que trastuzumab tiene el mismo epítipo, no se unió adicionalmente. Por el contrario, el anticuerpo 1E11 estaba unido adicionalmente a HER2-ECD, que estaba unido a trastuzumab, y por lo tanto se confirmó que tenía un epítipo que es diferente del de trastuzumab.

Con el fin de confirmar la región de dominio a la que se unen los clones 1E11, los cuatro subdominios (dominios 1-4) que constituyen el dominio extracelular de la proteína HER2 se produjeron individualmente usando células animales, a las que la región bisagra y la región Fc de Las IgG1 humanas estaban unidas, y se purificaron usando Protein-A. La unión de los clones de 1E11, trastuzumab, pertuzumab se confirmó mediante un ensayo ELISA con respecto a la proteína recombinante producida de este modo. Como puede verse en la figura 3B, los clones de 1E11 mostraron unirse al subdominio 4, como en el caso de trastuzumab.

A partir de los resultados anteriores, se confirmó que los clones de 1E11 se unen al subdominio 4 del ECD de la proteína HER2, pero se unen a un epítipo que es diferente del de trastuzumab (figura 3).

#### EJEMPLO 8: ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERDO DESARROLLADO PARA HER 2

Si los anticuerpos 1E11 desarrollados se unen específicamente a HER2 entre las proteínas de la familia de ErbB, a la que pertenece HER2, y si se unen a HER2 de especies distintas a los seres humanos se confirmó mediante el ensayo ELISA. Para confirmar si los anticuerpos 1E11 desarrollados se unen específicamente a HER2 entre las proteínas de la familia ErbB, los dominios extracelulares de EGFR, HER2, HER3 y HER4, que pertenecen a la familia de ErbB, se examinaron mediante un ensayo ELISA. Los dominios extracelulares de EGFR (EGFR-ECD-Fc) se produjeron de la misma manera que en HER2-ECD-Fc, y HER3 (R&D Systems, n.º 348-RB-050) y HER4 (R&D Systems, n.º 1131-ER-050) fueron comprados. Con el fin de confirmar si los anticuerpos desarrollados presentan reacciones cruzadas interespecíficas a las proteínas HER2 de diferentes especies, se usaron los dominios extracelulares de HER2 de seres humanos, un macaco de la India, un macaco cangrejero, un ratón y una rata, y se confirmaron mediante un ensayo ELISA. El dominio extracelular de un macaco cangrejero se produjo de la misma manera que en HER2-ECD-Fc humano, y el dominio extracelular de HER2 de un macaco de la India (Sino Biological Inc., n.º 90020-K08H), el dominio extracelular de HER2 de un ratón (Sino Biological Inc., n.º 50714-M08H), y el dominio extracelular de HER2 de una rata (Sino Biological Inc., n.º 80079-R08H) fueron comprados.

Como puede verse en las figuras 4A y 4B, se confirmó que los anticuerpos 1E11 desarrollados se unen específicamente a HER2 entre las proteínas de la familia de ErbB humanos, y tienen reacciones cruzadas interespecíficas a las proteínas HER2 de un macaco de la India y un macaco cangrejero.

#### EJEMPLO 9: ANÁLISIS DE APOPTOSIS DE ANTICUERPOS CONTRA HER2

Se analizó la capacidad de inducción de la apoptosis de los anticuerpos contra HER2 para dilucidar un mecanismo molecular subyacente de los efectos antineoplásicos del anticuerpo 1E11 coadministrado con trastuzumab. Para investigar la capacidad de inducción de la apoptosis, las células NCI-N87 y BT-474 se trataron con 10 µg/ml de anticuerpo 1E11, trastuzumab o su combinación durante 48 horas (10 µg/ml de 1E11 y 10 µg/ml de trastuzumab para administración combinada). Después del tratamiento con anticuerpos, las células se desprendieron con tripsina y se analizaron 500.000 células usando el kit de apoptosis ApoScreen Annexin V (SouthernBiotech, n.º 10010-02) mediante un análisis de citometría de flujo (Cytomics FC500, Beckman Coulter Inc.). (Figuras 5a y 5b).

Para medir las actividades de caspasa-3 y caspasa-7 que desempeñan un papel crucial en la apoptosis, se analizaron las eficacias antineoplásicas del anticuerpo 1E11, trastuzumab o una combinación de los mismos durante el tiempo de tratamiento. Las células NCI-N87 se trataron con 10 µg/ml de anticuerpos. Después de 24 horas y 48 horas de tratamiento, se realizó el ensayo de viabilidad celular usando Caspase-Glo (Promega, n.º G7571) (figura 5c). Se demostró que la viabilidad celular disminuyó bruscamente después de 24 horas de tratamiento. Basándose en dichos resultados, las actividades de caspasa-3/7 se midieron después de 24 horas de tratamiento. Las células NCI-N87 se trataron con 10 µg/ml de anticuerpos durante 24 horas. Se usó el ensayo Caspase-Glo 3/7 (Promega, n.º G809) para medir la actividad de caspasa-3/7 (figura 5d).

Como se representa en las figuras 5a y 5b, se demostró que el anticuerpo 1E11 solo ejerce actividad apoptótica contra el cáncer de estómago (células NCI-N87) y el cáncer de mama (células BT-474) que sobreexpresan HER2, a diferencia del trastuzumab. La actividad apoptótica del anticuerpo 1E11 se incrementó aún más con el tratamiento combinado con trastuzumab. El aumento de la actividad apoptótica del tratamiento combinado con 1E11 y trastuzumab se analizó debido al aumento de la actividad de caspasa-3/7 que desempeña un papel crucial en la apoptosis (figura 5d).

#### EJEMPLO 10: INHIBICIÓN DE SEÑALIZACIÓN CELULAR DE HER2 POR ANTICUERPOS

Para dilucidar el mecanismo antineoplásico de 1E11 en combinación con trastuzumab contra cáncer de estómago y cáncer de mama que sobreexpresan HER2, se analizaron las actividades de señalización de HER2 en las células. Las células NCI-N87 se trataron con 10 µg/ml de anticuerpos durante 24 horas. Después, las células se lisaron con

una solución de lisis celular [Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, dodecilsulfato sódico al 0,1 %, NaF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, PMSF 1 mM y cóctel inhibidor de proteasa (Sigma)] para obtener un lisado celular. El lisado celular se sometió al análisis de transferencia Western. Los anticuerpos contra HER2 (n.º 4290), pHER2 (n.º 2243), pHER3 (n.º 4791), EGFR (n.º 4267), pEGFR (n.º 3777), AKT (n.º 4691), pAKT (n.º 4060), ERK (n.º 4695) y pERK (n.º 4370) se compraron de Cell Signaling Technology. El anticuerpo contra HER3 (sc-285) se compró de Santa Cruz Biotechnology y el anticuerpo contra GAPDH (AbC-1001) como un control de carga se compró de AbClon. Los anticuerpos anti-ratón (AbC-5001) y anti-rata (AbC-5003) conjugados con peroxidasa de rábano picante también se compraron de AbClon. Las bandas se visualizaron usando AbSignal (AbClon, AbC-3001).

Se examinó, además, si el tratamiento combinado de 1E11 y trastuzumab inhibe la heterodimerización entre HER2 y EGFR o HER3 como otras proteínas de la familia de ErbB. Las células NCI-N87 se trataron con EGF para la inducción de la heterodimerización entre HER2 y EGFR, y se trataron con HRG para la inducción de la heterodimerización entre HER2 y HER3. Las células NCI-N87 se dividieron en partes alícuotas en un medio celular suplementado con FBR al 0,1% y se cultivaron durante 24 h. Después, las células se trataron con 10 µg/ml de anticuerpos durante 1 hora, y después con 200 ng/ml de EGF (R&D Systems, n.º 236-EG-200) o HRG (R&D Systems, n.º 377-HB/CF). Tres días más tarde, se ensayó la viabilidad celular.

Como se muestra en la figura 6a, el tratamiento combinado de 1E11 y trastuzumab contribuye a disminuir el nivel de la proteína HER2. Al disminuir el nivel de la proteína HER2, la proteína HER2 fosforilada también disminuyó. Se observaron niveles reducidos de HER3 y EGFR fosforiladas sin un cambio en el nivel de proteína total. Dichos resultados demuestran que el tratamiento combinado de 1E11 y trastuzumab es capaz de controlar las actividades de HER2, HER3 y EGFR. Mediante dichos controles de actividad, las actividades de AKT y ERK, factores cadena abajo de HER2 bien conocidos, también se alteraron sin un cambio en el nivel de proteína total.

Se demostró que el tratamiento combinado de 1E11 y trastuzumab dio como resultado una reducción de la proliferación celular por heterodimerización entre HER2 y EGFR (o HER3) (figura 6b). La proliferación de células NCI-N87 mediante EGF capaz de inducir heterodimerización entre HER2 y EGFR, y HRG capaz de inducir heterodimerización entre HER2 y HER3, se redujo mediante el tratamiento combinado de 1E11 y trastuzumab a un nivel similar a pertuzumab que se sabe que inhibe la unión de HER2 a otros receptores.

Estos resultados refieren que la señalización celular mediante la heterodimerización entre HER2 y EGFR (o HER3) se suprimió mediante el tratamiento combinado de 1E11 y trastuzumab.

#### EJEMPLO 11: EFICACIAS ANTINEOPLÁSICAS DE ANTICUERPOS EN MODELOS ANIMALES

Las eficacias antineoplásicas de 1E11 se evaluaron usando modelos animales. Se inyectaron por vía subcutánea ratones hembra lampiños atímicos (Daehan Biolink, Corea) con 5 x 10<sup>6</sup> células NCI-N87 para preparar un modelo de xenoinjerto. Se permitió que los tumores crecieran en un tamaño de aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>, y los ratones se aleatorizaron a cuatro grupos. Los animales de los cuatro grupos recibieron dos veces por semana administración intraperitoneal de 10 mg/kg de palivizumab (como control de isotipo de trastuzumab (MedImmune LLC)), 1E11, trastuzumab y combinación de 1E11 y trastuzumab, respectivamente. Para la administración combinada, cada anticuerpo se administró a una dosis de 10 mg/kg. Los volúmenes tumorales se midieron a lo largo del tiempo. En el día 22, los animales fueron sacrificados y los tumores se aislaron. Los volúmenes del tumor se calcularon usando la fórmula  $(L \cdot W^2)/2$ , donde "L" representa el diámetro del tumor más grande y "W" representa el diámetro del tumor más pequeño. Los tumores aislados se pesaron y se prepararon para análisis inmunohistoquímicos. Los tejidos del xenoinjerto tumoral se procesaron como cortes de muestras fijados con formalina e incluidos en parafina. Estos se examinaron mediante tinción con hematoxilina (DAKO, n.º CS700) y eosina (DAKO, n.º CS701) (H&E) y tinción de la proteína HER2 utilizando el anticuerpo contra HER2 (Cell Signaling Technology, n.º 4290).

1E11 solo inhibió el crecimiento tumoral en una medida similar a trastuzumab (figura 7a). 1E11 mostró una actividad antitumoral drásticamente incrementada en combinación con trastuzumab en comparación con el tratamiento con cada anticuerpo individual. La actividad antitumoral también se confirmó analizando la masa tumoral después de los experimentos (figura 7b). La reducción de las células que expresan HER2 mediante la combinación de 1E11 y trastuzumab se observó en la tinción inmunohistoquímica (figura 7c), que es compatible con los resultados de la transferencia Western (figura 6a). Estos resultados indican que 1E11 en combinación con trastuzumab inhibe drásticamente el crecimiento tumoral en comparación con el tratamiento con un anticuerpo individual, lo que se debe a la supresión de la expresión de la proteína HER2.

#### EJEMPLO 12: DESARROLLO DE ANTICUERPOS HUMANIZADOS Y CONFIRMACIÓN DE SUS EFECTOS

Los anticuerpos humanizados de los anticuerpos quiméricos 1E11 desarrollados en el ejemplo 4 se desarrollaron usando un método de injerto de CDR. Con respecto a los anticuerpos humanos para recibir la CDR de los anticuerpos desarrollados, los genes V y J de los genes de anticuerpos de la línea germinal humana con una alta homología basada en la secuencia de nucleótidos se seleccionaron usando IMGT/V-QUEST (Brochet, X. *et al.*, Nucl Acids Res. 36:503-508(2008)). Como un gen V y un gen J de una cadena pesada, se seleccionaron el gen IGHV3-48\*03 y el gen IGHJ4\*01, respectivamente, y su homología de secuencia fue del 85,07 % y el 87,23 %, respectivamente.

respectivamente. Adicionalmente, como un gen V y un gen J de una cadena ligera, se seleccionaron el gen IGKV1-39\*01 y el gen IGKJ1\*01, respectivamente, y su homología de secuencia fue del 81,36 % y el 81,08 %, respectivamente. Teniendo en cuenta un informe de que el injerto de CDR sola disminuye la afinidad, el H49 basado en la numeración de Kabat de la cadena pesada correspondiente a la zona de Vernier que puede afectar a toda la estructura de un anticuerpo se reemplazó con alanina en lugar de serina, que está en el gen de la línea germinal humana. El anticuerpo humanizado desarrollado hz1E11 se produjo en forma de IgG usando la línea celular FreeStyle™ 293F. Las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del hz1E11 desarrollado se describen en las SEQ ID NO: 24 y 26, respectivamente.

La afinidad de hz1E11, el anticuerpo humanizado desarrollado de 1E11, por HER2 se midió mediante un ensayo de resonancia del plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos se realizaron usando Biacore 3000. En primer lugar, los anticuerpos de cabra contra IgG humana se inmovilizaron a una concentración de 1000 UR en un chip sensor CM5 a través de un método de acoplamiento de amina. Trastuzumab, pertuzumab y hz1E11 se diluyeron respectivamente a 2,84  $\mu\text{M}$ , 5,68  $\mu\text{M}$  y 7,1  $\mu\text{M}$  usando un tampón HBS-P. Antes de unirse a la proteína HER2-ECD-His, cada anticuerpo se unió a una velocidad de 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  durante 180 segundos, y se permitió que el tampón fluyera sobre él para fines de estabilización. Después, se permitió que la proteína HER2-ECD-His se uniera a concentraciones de 640 nM, 320 nM, 160 nM, 80 nM, 40 nM, 20 nM y 0 nM durante 4 minutos, y se permitió que el tampón fluyera durante 15 minutos. El chip sensor se recicló permitiendo que el tampón de glicina-HCl (pH 1,5) 10 mM fluyera sobre él. Todos los datos de sensorgrama se analizaron mediante un modelo de interacción 1:1 usando el software BIAevaluation. Las afinidades de los anticuerpos se resumen en la tabla 5 a continuación. Las afinidades de trastuzumab y pertuzumab fueron de 1,94 nM y 1,89 nM, respectivamente, mientras que la afinidad del anticuerpo desarrollado 1E11 fue de 16,0 nM. La afinidad del anticuerpo humanizado de 1E11 fue de 10,4 nM, sin mostrar casi ninguna diferencia con el anticuerpo 1E11 existente.

TABLA 5

| Anticuerpos | Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | Kd (s <sup>-1</sup> ) | KD (nM) |
|-------------|---------------------------------------|-----------------------|---------|
| Trastuzumab | 3,9E+04                               | 7,6E-05               | 1,94    |
| Pertuzumab  | 3,6E+04                               | 6,8E-05               | 1,89    |
| 1E11        | 3,0E+04                               | 4,7E-04               | 16,0    |
| hz1E11      | 4,9E+04                               | 5,1E-04               | 10,4    |

El efecto antineoplásico de hz1E11, el anticuerpo humanizado desarrollado de 1E11, se confirmó en las líneas celulares de cáncer de estómago humano NCI-N87 y OE-19, que sobreexpresan HER2 (figura 8). El tratamiento individual de hz1E11 en células NCI-N87 mostró una disminución en la tasa de supervivencia del cáncer similar a la del tratamiento con trastuzumab, mientras que el tratamiento combinado de hz1E11 y trastuzumab mostró una disminución significativamente mayor en la tasa de supervivencia del cáncer en comparación con el tratamiento individual con cualquiera de los anticuerpos (figura 8A). Adicionalmente, el tratamiento combinado de hz1E11 y trastuzumab en OE-19, una línea celular de cáncer de estómago humano diferente, mostró una mayor disminución en la tasa de supervivencia del cáncer en comparación con el tratamiento individual con cualquiera de los anticuerpos (figura 8B). Adicionalmente, el tratamiento combinado de hz1E11 y trastuzumab mostró un efecto inhibidor ligeramente mayor que el tratamiento combinado de 1E11 y trastuzumab (figura 2A) contra la proliferación de células cancerosas (figura 8A). El tratamiento combinado de hz1E11 y trastuzumab mostró un mayor efecto inhibidor en las líneas celulares NCI-N87 OE-19 que el tratamiento combinado de trastuzumab y pertuzumab contra la proliferación de células cancerosas.

Los resultados anteriores indican que el hz1E11, el anticuerpo humanizado desarrollado de 1E11, tiene una capacidad de unión igual y un efecto antineoplásico mejorado ligeramente en comparación con el 1E11 convencional.

El efecto antineoplásico del tratamiento combinado de hz1E11, el anticuerpo humanizado desarrollado de 1E11, junto con trastuzumab se confirmó en un modelo de xenoinjerto usando NCI-N87. A los ratones que tenían un cáncer formado mediante el trasplante de NCI-N87 se les inyectó por vía intraperitoneal dos veces por semana el anticuerpo desarrollado y un grupo de control de isotipo de trastuzumab, hz1E11, trastuzumab y una combinación de hz1E11 y trastuzumab, respectivamente. El grupo de control de isotipo y trastuzumab se administraron a una dosis de 10 mg/kg. En el caso de un tratamiento combinado, se mezclaron hz1E11 y trastuzumab en una proporción de 1:1, y se administraron a una dosis de 1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg y 10 mg/kg basándose en cada anticuerpo. El tratamiento combinado de hz1E11 y trastuzumab mostró una disminución del crecimiento del cáncer de una manera dependiente de la dosis (figura 9). El efecto antineoplásico observado con la administración de 10 mg/kg de trastuzumab también se observó con la administración de 1 mg/kg de hz1E11 o trastuzumab. Se demostró que la administración de hz1E11 y trastuzumab en una dosis superior a 5 mg/kg no solo inhibe el crecimiento del cáncer sino que también disminuye el cáncer ya formado.

## Ejemplo 13: CONFIRMACIÓN DE LA REGIÓN DE UNIÓN DE ANTICUERPOS DESARROLLADOS

Con el fin de confirmar la importante región de los anticuerpos desarrollados para unión a antígenos, se realizó un ensayo de barrido de alanina que examina la capacidad de unión cambiando los aminoácidos correspondientes a CDR3 de la cadena pesada y la cadena ligera a alanina. Histidina (H), leucina (L), glicina (G), glicina (G), treonina (T) y serina (S) entre las regiones CDR3 de cadena pesada que corresponden a 95, 96, 97, 98, 99 y 100a de acuerdo con la numeración de Kabat, y glutamina (Q), glutamina (Q), leucina (L), tirosina (Y), serina (S) y treonina (T) entre las regiones CDR3 de cadena ligera que corresponden a 89, 90, 91, 92, 93 y 94 de acuerdo con la numeración de Kabat, se cambiaron a alanina usando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange (Stratagene, n.º 200518). Entre las CDR3 de cadena pesada, A100 se excluyó del ensayo porque el anticuerpo desarrollado tiene alanina. Después de expresar cada anticuerpo modificado en bacterias, se confirmó su expresión mediante una transferencia por puntos (dot-blot) después de obtener un extracto periplásmico del mismo, y se analizó la capacidad de unión con respecto al HER2-ECD a través de un ensayo ELISA (véase: figura 10).

TABLA 6

|        | Secuencia mutada    | Posición mutada | Capacidad de unión a Her2-ECD (absorbancia a 450 nm) |
|--------|---------------------|-----------------|--|
| CDR-L3 | AQLYSTPWT           | Q89A            | 1,711  |
|        | QALYSTPWT           | Q90A            | 1,705  |
|        | QQAYSTPWT           | L91A            | 1,492  |
|        | QQLASTPWT           | Y92A            | 1,803  |
|        | QQLYATPWT           | S93A            | 1,733  |
|        | QQLYSAPWT           | T94A            | 1,628  |
| CDR-H3 | ALGGTASFDY          | H95A            | 1,59   |
|        | HAGGTASFDY          | L96A            | 1,66   |
|        | HLAGTASFDY          | G97A            | 1,08   |
|        | HLGATASFDY          | G98A            | 0,051  |
|        | HLGGAASFDY          | T99A            | 0,839  |
|        | HLGGTAAFDY          | S100aA          | 1,597  |
|        | Anticuerpo original | hz1E11          | 1,75   |

Como puede verse en la tabla 6 y en las figuras 10A y 10B, los anticuerpos modificados se expresaron en un nivel similar, mientras que G98A de la cadena pesada mostró una pérdida completa de su capacidad de unión, y G97A de la cadena pesada mostró una disminución marcada en su capacidad de unión. El cambio en otras regiones no mostró ningún efecto notable sobre la unión antígeno-anticuerpo.

## Ejemplo 14: MEJORA DE LAS AFINIDADES DE ANTICUERPOS DESARROLLADOS

Con el fin de mejorar las afinidades de los anticuerpos desarrollados, se desarrolló una biblioteca con CDR3 aleatorizadas de cadena ligera y cadena pesada. F, D e Y entre las CDR3 de la cadena pesada que corresponden a F100b, D101 y Y102, los números de aminoácidos de acuerdo con la numeración de Kabat y P, W y T entre las CDR3 de la cadena ligera que corresponden a P95, W96 y T97 de acuerdo con la numeración de Kabat se excluyeron de la aleatorización porque son aminoácidos comúnmente descubiertos en anticuerpos humanos. Se desarrolló una biblioteca de anticuerpos de fagos con 20 aminoácidos aleatorizados de aminoácidos CDR3 de la cadena pesada y la cadena ligera excluyente de los aminoácidos descritos en la tecnología anterior (Phage display: a laboratory manual, Carlos Barbas III, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press). En particular, los cebadores usados anteriormente se relacionan con la región correspondiente a CDR3 de la cadena pesada y la cadena ligera, y se sintetizaron de tal manera que se mezclaron adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T) en una proporción igual para ser insertados aleatoriamente en la primera y segunda posición del codón correspondiente al aminoácido a aleatorizar, y la guanina (G) o la citosina (C) se mezclaron en una proporción igual para ser insertados en la tercera posición.

Con el fin de seleccionar los clones con afinidades mejoradas a partir de la biblioteca desarrollada, la proteína HER2-ECD-His se biotiniló usando el kit de EZ-Link de Sulfo-NHS-LC-Biotinilación (Thermo Scientific, n.º 21435), y se usó como antígenos para seleccionar anticuerpos. La biblioteca de anticuerpos de fagos desarrollada y la proteína biotina-HER2-ECD-His se dejaron unir a temperatura ambiente durante 2 horas, y los fagos unidos a los antígenos se separaron usando 50 µl de Dynabeads M-270 Estreptavidina (Invitrogen, n.º 653.06). El proceso de

ES 2 710 707 T3

selección anterior se realizó 4 veces, y las colonias que expresaron anticuerpos que se unen a HER2-ECD entre las colonias seleccionadas de este modo se seleccionaron mediante un ensayo ELISA usando extractos periplásmicos, y las secuencias de los anticuerpos expresados en las colonias seleccionadas se confirmaron mediante análisis de nucleótidos. Las secuencias de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada y la cadena ligera de los anticuerpos que se unen a HER2-ECD se resumen en las tablas 7 y 8 a continuación. El número 1 en cada tabla representa la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada y la cadena ligera de hz1E11.

5

TABLA 7

| Secuencias de CDRH3 de mutantes seleccionados a partir del proceso de mejora de afinidad |            |    |            |    |            |    |            |
|--|------------|----|------------|----|------------|----|------------|
| 1  | HLGGTASFDY | 14 | HLGGMSSFDY | 27 | HWGGTASFDY | 40 | PLGGTASFDY |
| 2  | AFGGTASFDY | 15 | HLGGMTSFDY | 28 | HYGGTASFDY | 41 | QLAGTASFDY |
| 3  | DLGGTASFDY | 16 | HLGGSSSFDY | 29 | MNGGTASFDY | 42 | SFGGTASFDY |
| 4  | FWGGTASFDY | 17 | HLGGTACFDY | 30 | NFGGTASFDY | 43 | SHGGTASFDY |
| 5  | HCGGTASFDY | 18 | HLGGTGAFDY | 31 | NHGGMASFDY | 44 | SLGGTASFDY |
| 6  | HFGGTASFDY | 19 | HLGGTGSFDY | 32 | NHGGTASFDY | 45 | SMGGTASFDY |
| 7  | HHGGTASFDY | 20 | HLGGTSTFDY | 33 | NIGGTASFDY | 46 | SNGGTASFDY |
| 8  | HIGGTASFDY | 21 | HLGGTTSFDY | 34 | NLGGTASFDY | 47 | SWGGTASFDY |
| 9  | HLCSTASFDY | 22 | HLGSTASFDY | 35 | NMGGTASFDY | 48 | SYGGTASFDY |
| 10   | HLCVTASFDY | 23 | HLVRTASFDY | 36 | NNGGTASFDY | 49 | YYGGTASFDY |
| 11   | HLGGAASFDY | 24 | HMGGTASFDY | 37 | NWGGTASFDY |    |            |
| 12   | HLGGLPSFDY | 25 | HRGGTASFDY | 38 | NYGGAASFDY |    |            |
| 13   | HLGGMASFDY | 26 | HVGGTASFDY | 39 | NYGGTASFDY |    |            |

10

TABLA 8

| Secuencias de CDRL3 de mutantes seleccionados a partir del proceso de mejora de afinidad |           |    |            |    |            |     |           |
|--|-----------|----|------------|----|------------|-----|-----------|
| 1  | QQLYSTPWT | 41 | QQLAYEPWT  | 81 | QQMAFVPWT  | 121 | QQMVRTPWT |
| 2  | DQLYGPWT  | 42 | QQLAYSPWT  | 82 | QQMAFYPTWT | 122 | QQMVRVPWT |
| 3  | DQMYSTPWT | 43 | QQLAYTPWT  | 83 | QQMAGFPWT  | 123 | QQMVSIPWT |
| 4  | HQLAFTPWT | 44 | QQLAYVPWT  | 84 | QQMASVPWT  | 124 | QQMYGTPWT |
| 5  | LQHNEFPWT | 45 | QQLGFAPWT  | 85 | QQMAYGPWT  | 125 | QQMYKTPWT |
| 6  | QDMSRTPWT | 46 | QQLGFIPWT  | 86 | QQMAYSPWT  | 126 | QQMYRTPWT |
| 7  | QELSTTPWT | 47 | QQLGFSPWT  | 87 | QQMAYTPWT  | 127 | QQNAFEPWT |
| 8  | QEMMRTPWT | 48 | QQLGFVPWT  | 88 | QQMDFTPWT  | 128 | QQNAFGPWT |
| 9  | QNLAYSPWT | 49 | QQLGYAPWT  | 89 | QQMEHTPWT  | 129 | QQNAFIPWT |
| 10   | QNMYGTPWT | 50 | QQLGYSPWT  | 90 | QQMFAIPWT  | 130 | QQNAFSPWT |
| 11   | QQAAFSPWT | 51 | QQLHSTPWT  | 91 | QQMFGSPWT  | 131 | QQNAFTPWT |
| 12   | QQAAYSPWT | 52 | QQLKNTPTWT | 92 | QQMFRTPWT  | 132 | QQNAFVPWT |
| 13   | QQAAYVPWT | 53 | QQLMRKPWT  | 93 | QQMFSTPWT  | 133 | QQNAYAPWT |
| 14   | QQCTSDPWT | 54 | QQLRASPWT  | 94 | QQMFSVPWT  | 134 | QQNAYGPWT |
| 15   | QQHDVGPWT | 55 | QQLRNLPWT  | 95 | QQMGFSPWT  | 135 | QQNAYNPWT |
| 16   | QQIAFGPWT | 56 | QQLRNTPWT  | 96 | QQMGYAPWT  | 136 | QQNAYSPWT |
| 17   | QQIAFNPWT | 57 | QQLRNVPWT  | 97 | QQMGYSPWT  | 137 | QQNFIAPWT |
| 18   | QQIAFSPWT | 58 | QQLRSAPWT  | 98 | QQMHIFPWT  | 138 | QQNMIVPWT |

ES 2 710 707 T3

| Secuencias de CDRL3 de mutantes seleccionados a partir del proceso de mejora de afinidad |            |    |           |     |           |     |           |
|--|------------|----|-----------|-----|-----------|-----|-----------|
| 19   | QQIAFTPWT  | 59 | QQLRSPWT  | 99  | QQMMAVPWT | 139 | QQNRISPWT |
| 20   | QQIAFVPWT  | 60 | QQLRSVPWT | 100 | QQMMKSPWT | 140 | QQNRIWPWT |
| 21   | QQIAKTPWT  | 61 | QQLRVIPWT | 101 | QQMMRTPWT | 141 | QQNRVIPWT |
| 22   | QQIAYSPWT  | 62 | QQLSFTPWT | 102 | QQMMRVPWT | 142 | QQNRVVPWT |
| 23   | QQIAYTPWT  | 63 | QQLSFVPWT | 103 | QQMRKIPWT | 143 | QQNSYSPWT |
| 24   | QQIAYVPWT  | 64 | QQLSKTPWT | 104 | QQMRNVPWT | 144 | QQNVIVPWT |
| 25   | QQIFSVPTWT | 65 | QQLSRAPWT | 105 | QQMRRVPWT | 145 | QQNVNVPWT |
| 26   | QQIGFSPWT  | 66 | QQLSRSPWT | 106 | QQMRSTPWT | 146 | QQNYKLPWT |
| 27   | QQIGWTPWT  | 67 | QQLSVTPWT | 107 | QQMSFSPWT | 147 | QQSAFVPWT |
| 28   | QQIMTLPTWT | 68 | QQLSYAPWT | 108 | QQMSHSPWT | 148 | QQSAYAPWT |
| 29   | QQIREIPTWT | 69 | QQLSYSPWT | 109 | QQMSKIPWT | 149 | QQSAYIPWT |
| 30   | QQISFMPWT  | 70 | QQLVRIPWT | 110 | QQMSRVPWT | 150 | QQSEACPWT |
| 31   | QQISFSPWT  | 71 | QQLVRNPWT | 111 | QQMSYAPWT | 151 | QQSFNTPWT |
| 32   | QQIYITPWT  | 72 | QQLVRTPWT | 112 | QQMSYGPWT | 152 | QQSKTVPWT |
| 33   | QQKAYAPWT  | 73 | QQLVRVPWT | 113 | QQMSYIPWT | 153 | QQTAFGPWT |
| 34   | QQKKGIPWT  | 74 | QQLYSSPWT | 114 | QQMSYSPWT | 154 | QQTAFSPWT |
| 35   | QQKMGNPWT  | 75 | QQMAFAPWT | 115 | QQMSYTPWT | 155 | QQTAYAPWT |
| 36   | QQKSVAPWT  | 76 | QQMAFGPWT | 116 | QQMSYVPWT | 156 | QQTAYSPWT |
| 37   | QQLAFAPWT  | 77 | QQMAFIPWT | 117 | QQMTRVPWT | 157 | QQTRRTPWT |
| 38   | QQLAFMPWT  | 78 | QQMAFNPWT | 118 | QQMVIIPWT | 158 | QQTSFAPWT |
| 39   | QQLAFSPWT  | 79 | QQMAFSPWT | 119 | QQMVREPWT | 159 | QQVAYSPWT |
| 40   | QQLAFVPWT  | 80 | QQMAFTPWT | 120 | QQMVRSPWT | 160 | QQVFAIPWT |

Con el fin de seleccionar clones con Koff mejorada entre los clones seleccionados, los clones se analizaron a través de Biacore 3000 (GE Healthcare). La proteína HER2-ECD-His se inmovilizó en un chip sensor CM5 a través de un método de acoplamiento de amina usando ECD/NHS. Después de expresar el anticuerpo de cada clon usando IPTG, se obtuvo un extracto periplásmico del mismo, y se dejó que se uniera a HER2-ECD-His. El valor de Koff para cada anticuerpo se analizó mediante el software de evaluación BIAevaluation. Basándose en lo anterior, se seleccionaron los anticuerpos con valor de Koff mejorado (véase: tabla 9a). La tabla 9a divulga los ejemplos representativos de los clones que muestran valores de Koff similares o mejorados en comparación con el anticuerpo original hz1E11, entre los clones desarrollados por los inventores de la presente invención.

TABLA 9a

| Clones                      | hz1E11    |            | Cadena con mutación introducida | koff     | Grado de reducción (veces) |
|-----------------------------|-----------|------------|---------------------------------|----------|----------------------------|
|                             | LCDR3     | HCDR3      |                                 |          |                            |
| hz1E11                      | QQLYSTPWT | HLGGTASFDY | -                               | 1,13E-03 | 1,0                        |
| M3-L-A1-3-1A12 (hz1E11-133) | QQNAYAPWT | HLGGTASFDY | L                               | 3,72E-05 | 30,4                       |
| M3-L-A1-3-1F11 (hz1E11-154) | QQTAFSPWT | HLGGTASFDY | L                               | 1,17E-04 | 9,7                        |
| M1-L-A1-3-1C3 (hz1E11-3)    | DQMYSTPWT | HLGGTASFDY | L                               | 1,52E-04 | 7,4                        |

ES 2 710 707 T3

| Clones         | hz1E11     |            | Cadena con mutación introducida | koff     | Grado de reducción (veces) |
|----------------|------------|------------|---------------------------------|----------|----------------------------|
|                | LCDR3      | HCDR3      |                                 |          |                            |
| M3-H-A1-2-1B12 | QQLYSTPWT  | NYGGTASFDY | H                               | 2,12E-04 | 5,3                        |
| M1-H-A1-2-1B5  | QQLYSTPWT  | HFGGTASFDY | H                               | 4,53E-04 | 2,5                        |
| M3-H-A1-1-1C11 | QQLYSTPWT  | SWGGTASFDY | H                               | 5,67E-04 | 2,0                        |
| M3-H-A1-1-1A10 | QQLYSTPWT  | SYGGTASFDY | H                               | 1,16E-03 | 1,0                        |
| M3-LH-A1-1-1H1 | QQNFIAPWT  | NYGGTASFDY | LH                              | 1,66E-03 | 0,7                        |
| M3-LH-A3-3-2B1 | QQLVRNPWT  | NFGGTASFDY | LH                              | 1,65E-04 | 6,5                        |
| M3-L-A3-4-2E8  | QQIAYVPWT  | HLGGTASFDY | L                               | 1,80E-04 | 5,9                        |
| M1-LH-A3-3-1A6 | QQLVRTPWT  | NYGGTASFDY | LH                              | 1,84E-04 | 5,8                        |
| M3-H-A3-3-2A7  | QQLSYSTPWT | NFGGTASFDY | H                               | 2,26E-04 | 4,7                        |
| M3-LH-A3-3-2F1 | QQNAYNPWT  | HLGGTASFDY | L                               | 2,45E-04 | 4,4                        |
| M3-LH-A3-3-2A5 | QQMFSTPWT  | HWGGTASFDY | LH                              | 2,98E-04 | 3,6                        |
| M3-H-A3-3-2D8  | QQLYSTPWT  | HWGGTASFDY | H                               | 3,30E-04 | 3,2                        |
| M3-LH-A1-2-2F4 | QQLVRIPWT  | NLGGTASFDY | LH                              | 3,31E-04 | 3,2                        |
| M3-L-A1-3-2C2  | QQLGFIPWT  | HLGGTASFDY | L                               | 5,26E-04 | 2,0                        |
| M3-H-A3-1-2F3  | QQLYSTPWT  | NLGGTASFDY | H                               | 7,70E-04 | 1,4                        |
| M3-H-A2-1-1F2  | QQLYSTPWT  | SNGGTASFDY | H                               | 1,27E-03 | 0,8                        |

Como puede verse en la tabla 9a, diversas CDRH3 representadas por la fórmula general 1 y CDRL3 representadas por la fórmula general 2 muestran valores de Koff similares o mejorados en comparación con CDRH3 y CDRL3 del anticuerpo original, hz1E11.

5 Entre las secuencias de CDR3 aleatorizadas de la cadena ligera, los experimentos se realizaron usando hz1E11-3, hz1E11-133 y hz1E11-154.

10 Las regiones variables de cadena pesada de hz1E11-3, hz1E11-133 y hz1E11-154 fueron las mismas que las de hz1E11, y la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera se describen en las SEQ ID NO: 247, 249 y 251, respectivamente.

15 Con el fin de confirmar el aumento de las afinidades de los 3 tipos de anticuerpos seleccionados, los anticuerpos se produjeron en forma de IgG. La IgG antihumana de cabra (Invitrogen, n.º H10500) a una concentración de 2000 UR se inmovilizó en un chip sensor CM5 a través del método ECD/NHS. Después, se dejó que los anticuerpos se unieran a una velocidad de 50 µl/min durante 5 minutos, y se dejó que el tampón fluyera durante 5 minutos para fines de estabilización. Las concentraciones de los anticuerpos usados para la unión de los anticuerpos fueron 0,4

5  $\mu\text{g/ml}$  para Trastuzumab (TRA), 0,8  $\mu\text{g/ml}$  para pertuzumab (PER) y 1  $\mu\text{g/ml}$  para hz1E11 y los anticuerpos seleccionados. Después de estabilizar los anticuerpos, se dejó que la proteína HER2-ECD-His a concentraciones de 640 nM, 320 nM, 160 nM, 80 nM, 40 nM, 20 nM y 0 nM se uniera a una velocidad de 50  $\mu\text{l/min}$  durante 4 minutos, y se dejó que el tampón fluyera durante 15 minutos para separación. Después de analizar cada una de las concentraciones, se reciclaron usando glicina 10 mM (pH 1,5) y se realizaron los ensayos posteriores. Las afinidades de los anticuerpos se analizaron a través del software BIAevaluation. Los resultados del análisis se resumen en la tabla 9b.

TABLA 9b

| Anticuerpos | Ka (1/Ms) | kd (1/s) | Rmax | KD (M)   |
|-------------|-----------|----------|------|----------|
| hz1E11      | 3,60E+04  | 8,30E-04 | 61   | 2,30E-08 |
| hz1E11-3    | 3,80E+04  | 2,00E-04 | 64   | 5,20E-09 |
| hz1E11-133  | 6,40E+04  | 9,90E-05 | 68   | 1,50E-09 |
| hz1E11-154  | 8,60E+04  | 9,90E-05 | 65   | 1,10E-09 |
| TRA         | 4,90E+04  | 1,50E-04 | 43   | 3,00E-09 |
| PER         | 3,80E+04  | 1,20E-04 | 56   | 3,30E-09 |

10 En la tabla 9b anterior, ka, kd, Rmax y KD respectivamente indican la constante de velocidad de asociación, la constante de velocidad de disociación, la capacidad de unión máxima y la constante de disociación en equilibrio.

15 Como puede verse en la tabla 9b, hz1E11-133 y hz1E11-154 mostraron una disminución de 8,4 veces en el valor de Koff, es decir, los valores de kd, en comparación con los de hz1E11, mientras que mostraron un gran aumento en el valor de kon, es decir, el valor de ka. En conclusión, con respecto a la afinidad final, hz1E11-133 mostró 1,5 nM y hz1E11-154 mostró 1,1 nM, que fueron una mejora de 15 veces y una mejora de 20 veces en comparación con la de hz1E11.

20 **Ejemplo 15: CONFIRMACIÓN DE LOS EFECTOS ANTINEOPLÁSICOS DE ANTICUERPOS CON AFINIDADES MEJORADAS**

25 Los efectos antineoplásicos de los anticuerpos con afinidades mejoradas se confirmaron en relación con el cáncer de estómago y el cáncer de mama que sobreexpresan HER2. Se analizaron tasas de supervivencia de las células cancerosas cuando NCI-N87 y OE-19, líneas celulares de cáncer de estómago que sobreexpresan HER2, BT-474, una línea celular de cáncer de mama que sobreexpresa de HER2 se trataron con tratamiento individual mediante cada anticuerpo solo o un tratamiento combinado junto con trastuzumab, de acuerdo con la concentración.

30 Como puede verse en las figuras 11A a 11F, los anticuerpos hz1E11-3, hz1E11-133 y hz1E11-154 con afinidades mejoradas mostraron efectos mejorados en el tratamiento individual y el tratamiento combinado en comparación con la de hz1E11.

Listado de secuencias.txt

35 <110> AbcClon. Inc  
 <120> Anticuerpos capaces de unirse específicamente a HER2  
 <130> PP140042  
 40 <150> 10-2013-0055912  
 <151> 16-05-2013  
 <160> 251  
 45 <170> KopatentIn 2.0  
 <210> 1  
 <211> 5  
 50 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> CDRH1 de anticuerpo 1E11



# ES 2 710 707 T3

<400> 1

Ser Tyr Thr Met Ser  
1 5

5 <210> 2  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> CDRH2 de anticuerpo 1E11

<400> 2

Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys  
1 5 10 15

15 Gly

<210> 3  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> CDRH3 de anticuerpo 1E11

25 <400> 3

His Leu Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

30 <210> 4  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> CDRL1 de anticuerpo 1E11

<400> 4

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala  
1 5 10

40 <210> 5  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> CDRL2 de anticuerpo 1E11

50 <400> 5

Ala Thr Ser Leu Ala Asp  
1 5

55 <210> 6  
<211> 9  
<212> PRT

# ES 2 710 707 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDRL3 de anticuerpo 1E11

5

<400> 6

Gln Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 7

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de 1E11

15

<400> 7

gaggtgaagt tggtagtc tgggggaggt ttagtcagc ctggagggtc cctgaaactc 60  
 tcctgtcag cctctggatt cacttcagt agctatacca tctctgggt tcgccagact 120  
 ccagagaaga ggctggagtg ggtgcatac attagtaatg gtggtgtag cacttactat 180  
 ccagacactg taaagggccg atccaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240  
 ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagacatcta 300  
 ggtgggactg cctcttttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctca 357

20

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 1E11

30

<400> 8

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

<210> 9

# ES 2 710 707 T3

<211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de 1E11  
 <400> 9

```

gacattcaga tgactcagtc tctgcctcc cagtctgcat ctctgggaga aaggtcacc      60
atcacatgcc tggcaagtca gaccattggt acatggtag catggtatca gcagaâacca      120
gggaaatctc ctgactcct gatttatgtt gcaaccagcc tggcagatgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa tttctttca agatcagcag cctacaggct      240
gaagatttg taagttatta ctgtcaacaa ctttacagta ctccgtggac gttcggtgga      300
gggaccaagc tggagctgaa a                                     321
  
```

10 <210> 10  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 1E11

20 <400> 10

```

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

25 <210> 11  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Región constante de cadena kappa de IgG humana

<400> 11

# ES 2 710 707 T3

cgtacgggtgg ctgcaccatc tgtcttcac tcctccgcat ctgatgagca gttgaaatct 60

ggaactgcct ctgtgtgtg cctgctgaat aactctatc ccagagaggc caaagtacag 120

tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240

aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagttcgcc cgtcacaaag 300

agcttcaaca ggggagagtg ttaa 324

- 5 <210> 12
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Región constante de cadena kappa de IgG humana
- <400> 12

```

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

- 15 <210> 13
- <211> 990
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 20 <220>
- <223> Región constante de cadena pesada de IgG humana
- <400> 13

## ES 2 710 707 T3

```

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg      60
ggcacagcgg cctgggctg cctgggcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg     120
tggaactcag ggcacctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca     180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagctggg caccagacc      240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc     300
aaatctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga      360
ccgtcagctt tctcttccc cccaaaacc aaggacccc tcatgatctc ccggaccct      420
gaggtcacat gctgggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtaaa gttcaactgg     480
tacgtggagc gctgggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac     540
agcacgtacc gttgggtcag cgtctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag     600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc     660

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag      720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc     780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg     840
ctggactccg acggctcctt cttctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg     900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg     960
cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa                                     990

```

- 5 <210> 14
- <211> 330
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Región constante de cadena pesada de IgG humana
  
- <400> 14

# ES 2 710 707 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

5

<210> 15  
 <211> 81  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> LF-1

# ES 2 710 707 T3

|    |   |  |    |
|----|---|--|----|
|    | <400> 15  |  |    |
|    |   | ccgatcgata tggagacaga cacactcctg ctatgggtac tgctgctctg ggtccaggt | 60 |
|    |   | tccacgtggg atattcagat g  | 81 |
| 5  | <210> 16<br><211> 26<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |  |    |
| 10 | <220><br><223> LR-1   |  |    |
|    | <400> 16  |  |    |
|    | <b>cggcgtacgt ttcagctcca gcttgg</b>                             | <b>26</b>  |    |
| 15 | <210> 17<br><211> 80<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |  |    |
| 20 | <220><br><223> HF-1   |  |    |
|    | <400> 17  |  |    |
| 25 |   | ccgatcgata tggagacaga cacactcctg ctatgggtac tgctgctctg ggtccaggt | 60 |
|    |   | tccacgtggg aggtgaagct  | 80 |
| 30 | <210> 18<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |  |    |
|    | <220><br><223> HR-1   |  |    |
| 35 | <400> 18  |  |    |
|    | <b>cgggctagct gaggagacgg tgac</b>                               | <b>24</b>  |    |
| 40 | <210> 19<br><211> 27<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |  |    |
| 45 | <220><br><223> Ck-F   |  |    |
|    | <400> 19  |  |    |
|    | <b>ggagctgaaa cgtacggtgg ctgcacc</b>                            | <b>27</b>  |    |
| 50 | <210> 20<br><211> 28<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |  |    |
| 55 | <220><br><223> Ck-R   |  |    |
|    | <400> 20  |  |    |
|    | <b>ccgctcgagt taacactctc ccctgttg</b>                           | <b>28</b>  |    |
| 60 |   |  |    |

# ES 2 710 707 T3

<210> 21  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> CH-F  
 <400> 21  
 10 **caccgtctcc tcagctagca ccaagggccc atcg** 34  
 <210> 22  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> CH-R  
 20 <400> 22  
**ccgctcgagt cattaccgg gggacagggg g** 31  
 <210> 23  
 <211> 357  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de hz1E11  
 30 <400> 23  
 gaagtgcagc tagtggagtc aggcggcgggt ttagtgcagc ccgggggctc cctcaggctg 60  
 tcttgcgccg caagtggatt taccttcagc agctatacaa tgtcttgggt cagacaagcg 120  
 cctggaaagg gactggagtg ggtagcctac atctccaacg ggggcggaag tacgtattat 180  
 ccagatactg ttaaaggag attacaatt agcagagaca atgccaagaa ttccttgtat 240  
 ctgcagatga actctctcag agctgaagat accgcagtct actattgtgc tagacacctg 300  
 ggtgggaccg cctccttcca ctactggggc cagggtacac ttgttactgt gtcattct 357  
 35 <210> 24  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de hz1E11  
 <400> 24



# ES 2 710 707 T3

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

5 <210> 25  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de hz1E11  
 <400> 25

```

gatatccaga tgacacaaag cccatcatct ttatctgccca gcgtgggaga tagagtgacc      60
atcacatgtc tggcatcaca gaccatcggga acttgggtgg cctggtacca gcaaaaacca      120
ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgtc gcaacgagtc tcgctgacgg tgtgccttcc      180
agatttccg gtccggcag cggcacagac ttactctga caattagttc cctgcagccc      240
gaggacttcg ctacttatta ctgccagcag cttatagca ccccctggac cttcgggcag      300
gggaccaaag ttgaaataaa g                                     321
  
```

15 <210> 26  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de hz1E11  
 <400> 26

# ES 2 710 707 T3

```

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

```

5 <210> 27  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia sustituida con alanina de CDRH3 de hz1E11  
 <400> 27

```

Ala Leu Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr
          1           5           10

```

15 <210> 28  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia sustituida con alanina de CDRH3 de hz1E11

25 <400> 28

```

His Ala Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr
          1           5           10

```

30 <210> 29  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Secuencia sustituida con alanina de CDRH3 de hz1E11

<400> 29

```

His Leu Ala Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr
          1           5           10

```

40 <210> 30  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45

# ES 2 710 707 T3

<220>  
<223> Secuencia sustituida con alanina de CDRH3 de hz1E11

5 <400> 30

His Leu Gly Ala Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 31  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia sustituida con alanina de CDRH3 de hz1E11

15 <400> 31

His Leu Gly Gly Ala Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

20 <210> 32  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Secuencia sustituida con alanina de CDRH3 de hz1E11

<400> 32

30 His Leu Gly Gly Thr Ala Ala Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 33  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia sustituida con alanina de CDRL3 de hz1E11

40 <400> 33

Ala Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

45 <210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Secuencia sustituida con alanina de CDRL3 de hz1E11

<400> 34

Gln Ala Leu Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

# ES 2 710 707 T3

<210> 35  
<211> 9  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia sustituida con alanina de CDRL3 de hz1E11

10 <400> 35

Gln Gln Ala Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 36  
15 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Secuencia sustituida con alanina de CDRL3 de hz1E11

<400> 36

Gln Gln Leu Ala Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

25 <210> 37  
<211> 9  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia sustituida con alanina de CDRL3 de hz1E11

<400> 37

35 <210> 38  
<211> 9  
<212> PRT  
40 <213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Secuencia sustituida con alanina de CDRL3 de hz1E11

<400> 38

Gln Gln Leu Tyr Ser Ala Pro Trp Thr  
1 5

50 <210> 39  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 39

# ES 2 710 707 T3

Ala Phe Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

5 <210> 40  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
  
<400> 40

Asp Leu Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

15 <210> 41  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
  
<400> 41

Phe Trp Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

30 <210> 42  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
  
<400> 42

His Cys Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

40 <210> 43  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
  
<400> 43

His Phe Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

50 <210> 44  
<211> 10  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial

## ES 2 710 707 T3

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

5 <400> 44

                                His His Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
  1                  5  10

<210> 45  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

15 <400> 45

                                His Ile Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
  1                  5  10

20 <210> 46  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

30 <400> 46

                                His Leu Cys Ser Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
  1                  5  10

<210> 47  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

40 <400> 47

                                His Leu Cys Val Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
  1                  5  10

45 <210> 48  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 48

                                His Leu Gly Gly Ala Ala Ser Phe Asp Tyr  
  1                  5  10

55

# ES 2 710 707 T3

5  
<210> 49  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
  
<400> 49  
10  
His Leu Gly Gly Leu Pro Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10  
  
<210> 50  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
20  
<400> 50  
  
His Leu Gly Gly Met Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10  
  
25  
<210> 51  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
30  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
  
<400> 51  
  
His Leu Gly Gly Met Ser Ser Phe Asp Tyr  
35  
1 5 10  
  
<210> 52  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
  
<400> 52  
  
His Leu Gly Gly Met Thr Ser Phe Asp Tyr  
45  
1 5 10  
  
50  
<210> 53  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
55  
  
<400> 53

# ES 2 710 707 T3

His Leu Gly Gly Ser Ser Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

5 <210> 54  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
<400> 54

His Leu Gly Gly Thr Ala Cys Phe Asp Tyr  
1 5 10

15 <210> 55  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
<400> 55

His Leu Gly Gly Thr Gly Ala Phe Asp Tyr  
1 5 10

25 <210> 56  
<211> 10  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
35 <400> 56

His Leu Gly Gly Thr Gly Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

40 <210> 57  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
<400> 57

His Leu Gly Gly Thr Ser Thr Phe Asp Tyr  
1 5 10

50 <210> 58  
<211> 10  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial



# ES 2 710 707 T3

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

5 <400> 58

His Leu Gly Gly Thr Thr Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 59  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

15 <400> 59

His Leu Gly Ser Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

20 <210> 60  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 60

30 His Leu Tyr Arg Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 61  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

40 <400> 61

His Met Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

45 <210> 62  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 62

55 His Arg Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 63  
<211> 10

# ES 2 710 707 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
5 <223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 63

His Val Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

10 <210> 64  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 64

20 His Trp Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 65  
<211> 10  
25 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

30 <400> 65

His Tyr Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

35 <210> 66  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 66

Met Asn Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

45 <210> 67  
<211> 10  
<212> PRT  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

55 <400> 67

# ES 2 710 707 T3

Asn Phe Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

5 <210> 68  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
<400> 68

Asn His Gly Gly Met Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

15 <210> 69  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
<400> 69

Asn His Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

25 <210> 70  
<211> 10  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
35 <400> 70

Asn Ile Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

40 <210> 71  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11  
<400> 71

Asn Leu Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

50 <210> 72  
<211> 10  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

# ES 2 710 707 T3

<400> 72

Asn Met Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

5

<210> 73  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

15

<400> 73

Asn Asn Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

20

<210> 74  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 74

Asn Trp Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

30

<210> 75  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 75

Asn Tyr Gly Gly Ala Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

40

<210> 76  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

50

<400> 76

Asn Tyr Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

55

<210> 77  
<211> 10  
<212> PRT

# ES 2 710 707 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

5

<400> 77

Pro Leu Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

10

<210> 78  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 78

Gln Leu Ala Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

20

<210> 79  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

30

<400> 79

Ser Phe Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

35

<210> 80  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 80

Ser His Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

45

<210> 81  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 81

55

Ser Leu Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

# ES 2 710 707 T3

<210> 82  
<211> 10  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

10 <400> 82

Ser Met Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 83  
<211> 10  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 83

Ser Asn Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

25 <210> 84  
<211> 10  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 84

35 <210> 85  
<211> 10  
<212> PRT  
40 <213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 85

Ser Trp Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 86  
<211> 10  
<212> PRT  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
55 <223> Secuencia aleatorizada de CDRH3 de hz1E11

<400> 86

# ES 2 710 707 T3

Tyr Tyr Gly Gly Thr Ala Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

5 <210> 87  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 87

Asp Gln Leu Tyr Gly Thr Pro Trp Thr  
1 5

15 <210> 88  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 88

Asp Gln Met Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

25 <210> 89  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 89

His Gln Leu Ala Phe Thr Pro Trp Thr  
1 5

40 <210> 90  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 90

Leu Gln His Asn Glu Phe Pro Trp Thr  
1 5

50 <210> 91  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

# ES 2 710 707 T3

<400> 91

Gln Asp Met Ser Arg Thr Pro Trp Thr  
1 5

5 <210> 92  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 92

Gln Glu Leu Ser Thr Thr Pro Trp Thr  
1 5

15

<210> 93  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

25 <400> 93

Gln Glu Met Met Arg Thr Pro Trp Thr  
1 5

30 <210> 94  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 94

Gln Asn Leu Ala Tyr Ser Pro Trp Thr  
1 5

40

<210> 95  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 95

50

Gln Asn Met Tyr Gly Thr Pro Trp Thr  
1 5

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11



# ES 2 710 707 T3

<400> 96

Gln Gln Ala Ala Phe Ser Pro Trp Thr  
1 5

5 <210> 97  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 97

Gln Gln Ala Ala Tyr Ser Pro Trp Thr  
1 5

15 <210> 98  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

25 <400> 98

Gln Gln Ala Ala Tyr Val Pro Trp Thr  
1 5

30 <210> 99  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 99

Gln Gln Cys Thr Ser Asp Pro Trp Thr  
1 5

40 <210> 100  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 100

50 Gln Gln His Asp Val Gly Pro Trp Thr  
1 5

55 <210> 101  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

# ES 2 710 707 T3

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

5 <400> 101

Gln Gln Ile Ala Phe Gly Pro Trp Thr  
1 5

<210> 102  
<211> 9  
10 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

15 <400> 102

Gln Gln Ile Ala Phe Asn Pro Trp Thr  
1 5

20 <210> 103  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 103

Gln Gln Ile Ala Phe Ser Pro Trp Thr  
1 5

30 <210> 104  
<211> 9  
<212> PRT  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

40 <400> 104

Gln Gln Ile Ala Phe Thr Pro Trp Thr  
1 5

45 <210> 105  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

50 <400> 105

Gln Gln Ile Ala Phe Val Pro Trp Thr  
1 5

55 <210> 106

# ES 2 710 707 T3

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 106

Gln Gln Ile Ala Lys Thr Pro Trp Thr

10 1 5

<210> 107  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

20 <400> 107

Gln Gln Ile Ala Tyr Ser Pro Trp Thr

1 5

25 <210> 108  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 108

Gln Gln Ile Ala Tyr Thr Pro Trp Thr

1 5

35 <210> 109  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 109

45 Gln Gln Ile Ala Tyr Val Pro Trp Thr

1 5

50 <210> 110  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 110

# ES 2 710 707 T3

Gln Gln Ile Phe Ser Val Pro Trp Thr  
1 5

5 <210> 111  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 111

Gln Gln Ile Gly Phe Ser Pro Trp Thr  
1 5

15 <210> 112  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 112

Gln Gln Ile Gly Trp Thr Pro Trp Thr  
1 5

25 <210> 113  
<211> 9  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
35 <400> 113

Gln Gln Ile Met Thr Leu Pro Trp Thr  
1 5

40 <210> 114  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 114

Gln Gln Ile Arg Glu Ile Pro Trp Thr  
1 5

50 <210> 115  
<211> 9  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

# ES 2 710 707 T3

<400> 115

Gln Gln Ile Ser Phe Met Pro Trp Thr  
1 5

5 <210> 116  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 116

Gln Gln Ile Ser Phe Ser Pro Trp Thr  
1 5

15 <210> 117  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

25 <400> 117

Gln Gln Ile Tyr Ile Thr Pro Trp Thr  
1 5

30 <210> 118  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 118

Gln Gln Lys Ala Tyr Ala Pro Trp Thr  
1 5

40 <210> 119  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 119

50 <210> 120  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>

# ES 2 710 707 T3

<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 120

5 Gln Gln Lys Met Gly Asn Pro Trp Thr  
1 5

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

15 <400> 121

Gln Gln Lys Ser Val Ala Pro Trp Thr  
1 5

<210> 122

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 122

Gln Gln Leu Ala Phe Ala Pro Trp Thr  
1 5

30 <210> 123

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 123

40 Gln Gln Leu Ala Phe Met Pro Trp Thr  
1 5

<210> 124

45 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 124

Gln Gln Leu Ala Phe Ser Pro Trp Thr  
1 5

55 <210> 125

# ES 2 710 707 T3

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 125

Gln Gln Leu Ala Phe Val Pro Trp Thr  
1 5

10 <210> 126  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

20 <400> 126

Gln Gln Leu Ala Tyr Glu Pro Trp Thr  
1 5

25 <210> 127  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 127

Gln Gln Leu Ala Tyr Ser Pro Trp Thr  
1 5

35 <210> 128  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 128

45 Gln Gln Leu Ala Tyr Thr Pro Trp Thr  
1 5

50 <210> 129  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 129

# ES 2 710 707 T3

Gln Gln Leu Ala Tyr Val Pro Trp Thr  
1 5

5  
<210> 130  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 130

Gln Gln Leu Gly Phe Ala Pro Trp Thr  
1 5

15  
<210> 131  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 131

Gln Gln Leu Gly Phe Ile Pro Trp Thr  
1 5

25  
<210> 132  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 132

Gln Gln Leu Gly Phe Ser Pro Trp Thr  
1 5

35  
<210> 133  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 133

Gln Gln Leu Gly Phe Val Pro Trp Thr  
1 5

45  
<210> 134  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50  
55



# ES 2 710 707 T3

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

5 <400> 134

Gln Gln Leu Gly Tyr Ala Pro Trp Thr  
1 5

<210> 135  
<211> 9  
10 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

15 <400> 135

Gln Gln Leu Gly Tyr Ser Pro Trp Thr  
1 5

20 <210> 136  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 136

Gln Gln Leu His Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

30 <210> 137  
<211> 9  
<212> PRT  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

40 <400> 137

Gln Gln Leu Lys Asn Thr Pro Trp Thr  
1 5

45 <210> 138  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

50 <400> 138

Gln Gln Leu Met Arg Lys Pro Trp Thr  
1 5

55 <210> 139

# ES 2 710 707 T3

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 139

Gln Gln Leu Arg Ala Ser Pro Trp Thr  
1 5

10 <210> 140  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

20 <400> 140

Gln Gln Leu Arg Asn Leu Pro Trp Thr  
1 5

25 <210> 141  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 141

Gln Gln Leu Arg Asn Ser Pro Trp Thr  
1 5

35 <210> 142  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 142

45 Gln Gln Leu Arg Asn Val Pro Trp Thr  
1 5

50 <210> 143  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

55 <400> 143

# ES 2 710 707 T3

Gln Gln Leu Arg Ser Ala Pro Trp Thr  
1 5

5 <210> 144  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 144

Gln Gln Leu Arg Ser Ser Pro Trp Thr  
1 5

15 <210> 145  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 145

Gln Gln Leu Arg Ser Val Pro Trp Thr  
1 5

25 <210> 146  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 146

Gln Gln Leu Arg Val Ile Pro Trp Thr  
1 5

35 <210> 147  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 147

Gln Gln Leu Ser Phe Thr Pro Trp Thr  
1 5

45 <210> 148  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

# ES 2 710 707 T3

<400> 148

Gln Gln Leu Ser Phe Val Pro Trp Thr  
1 5

5 <210> 149  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 149

Gln Gln Leu Ser Lys Thr Pro Trp Thr  
1 5

15 <210> 150  
<211> 9  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

25 <400> 150

Gln Gln Leu Ser Arg Ala Pro Trp Thr  
1 5

30 <210> 151  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 151

Gln Gln Leu Ser Arg Ser Pro Trp Thr  
1 5

40 <210> 152  
<211> 9  
<212> PRT  
45 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

50 <400> 152

Gln Gln Leu Ser Val Thr Pro Trp Thr  
1 5

55 <210> 153  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

# ES 2 710 707 T3

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

5 <400> 153

Gln Gln Leu Ser Tyr Ala Pro Trp Thr  
1 5

<210> 154  
<211> 9  
10 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

15 <400> 154

Gln Gln Leu Ser Tyr Ser Pro Trp Thr  
1 5

20 <210> 155  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 155

Gln Gln Leu Val Arg Ile Pro Trp Thr  
1 5

30 <210> 156  
<211> 9  
<212> PRT  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

40 <400> 156

Gln Gln Leu Val Arg Asn Pro Trp Thr  
1 5

45 <210> 157  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

50 <400> 157

Gln Gln Leu Val Arg Thr Pro Trp Thr  
1 5

55 <210> 158  
<211> 9  
<212> PRT

# ES 2 710 707 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
 5  
 <400> 158  
  
Gln Gln Leu Val Arg Val Pro Trp Thr  
1 5

10  
 <210> 159  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
  
 <400> 159

Gln Gln Leu Tyr Ser Ser Pro Trp Thr  
1 5

20  
 <210> 160  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 25  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

30  
 <400> 160

Gln Gln Met Ala Phe Ala Pro Trp Thr  
1 5

35  
 <210> 161  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

40  
 <400> 161

Gln Gln Met Ala Phe Gly Pro Trp Thr  
1 5

45  
 <210> 162  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50  
 <220>  
 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 162

55  
Gln Gln Met Ala Phe Ile Pro Trp Thr  
1 5

# ES 2 710 707 T3

5 <210> 163  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

10 <400> 163  
Gln Gln Met Ala Phe Asn Pro Trp Thr  
1 5

15 <210> 164  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

20 <400> 164  
Gln Gln Met Ala Phe Ser Pro Trp Thr  
1 5

25 <210> 165  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 165  
Gln Gln Met Ala Phe Thr Pro Trp Thr  
1 5

35 <210> 166  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

40 <400> 166  
Gln Gln Met Ala Phe Val Pro Trp Thr  
1 5

45 <210> 167  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

50 <400> 167

55 <210> 167  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 167

# ES 2 710 707 T3

Gln Gln Met Ala Phe Tyr Pro Trp Thr  
1 5

5  
<210> 168  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 168

Gln Gln Met Ala Gly Phe Pro Trp Thr  
1 5

15  
<210> 169  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 169

Gln Gln Met Ala Ser Val Pro Trp Thr  
1 5

25  
<210> 170  
<211> 9  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
35 <400> 170

Gln Gln Met Ala Tyr Gly Pro Trp Thr  
1 5

40  
<210> 171  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 171

Gln Gln Met Ala Tyr Ser Pro Trp Thr  
1 5

50  
<210> 172  
<211> 9  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial

<220>



# ES 2 710 707 T3

<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 172

5 Gln Gln Met Ala Tyr Thr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 173

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

15 <400> 173

Gln Gln Met Asp Phe Thr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 174

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 174

Gln Gln Met Glu His Thr Pro Trp Thr  
1 5

30 <210> 175

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 175

40 Gln Gln Met Phe Ala Ile Pro Trp Thr  
1 5

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

50 <400> 176

Gln Gln Met Phe Gly Ser Pro Trp Thr  
1 5

55 <210> 177

<211> 9

# ES 2 710 707 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
5 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 177

Gln Gln Met Phe Arg Thr Pro Trp Thr  
1 5

10 <210> 178  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 178

20 Gln Gln Met Phe Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

25 <210> 179  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 179

Gln Gln Met Phe Ser Val Pro Trp Thr  
1 5

35 <210> 180  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 180

Gln Gln Met Gly Phe Ser Pro Trp Thr  
1 5

45 <210> 181  
<211> 9  
<212> PRT  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

55 <400> 181

# ES 2 710 707 T3

Gln Gln Met Gly Tyr Ala Pro Trp Thr

1 5

5 <210> 182  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 182

Gln Gln Met Gly Tyr Ser Pro Trp Thr  
1 5

15 <210> 183  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 183

Gln Gln Met His Ile Phe Pro Trp Thr  
1 5

25 <210> 184  
<211> 9  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
35 <400> 184

Gln Gln Met Met Ala Val Pro Trp Thr  
1 5

40 <210> 185  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 185

Gln Gln Met Met Lys Ser Pro Trp Thr  
1 5

50 <210> 186  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

# ES 2 710 707 T3

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

5 <400> 186

Gln Gln Met Met Arg Thr Pro Trp Thr  
1 5

10 <210> 187  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 187

Gln Gln Met Met Arg Val Pro Trp Thr  
1 5

20 <210> 188  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 188

30 <210> 189  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

Gln Gln Met Arg Lys Ile Pro Trp Thr  
1 5

35 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 189

Gln Gln Met Arg Asn Val Pro Trp Thr  
1 5

45 <210> 190  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 190

Gln Gln Met Arg Arg Val Pro Trp Thr  
1 5

55 <210> 191  
<211> 9

# ES 2 710 707 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
5 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 191

Gln Gln Met Arg Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

10 <210> 192  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 192 Listado de secuencias.txt

20 Gln Gln Met Ser Phe Ser Pro Trp Thr  
1 5

<210> 193  
<211> 9  
25 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

30 <400> 193

Gln Gln Met Ser His Ser Pro Trp Thr  
1 5

35 <210> 194  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 194

Gln Gln Met Ser Lys Ile Pro Trp Thr  
1 5

45 <210> 195  
<211> 9  
<212> PRT  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

55 <400> 195

Gln Gln Met Ser Arg Val Pro Trp Thr  
1 5

# ES 2 710 707 T3

<210> 196  
<211> 9  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

10 <400> 196

Gln Gln Met Ser Tyr Ala Pro Trp Thr  
1 5

<210> 197  
<211> 9  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 197

Gln Gln Met Ser Tyr Gly Pro Trp Thr  
1 5

25 <210> 198  
<211> 9  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 198

35 <210> 199  
<211> 9  
<212> PRT  
40 <213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 199

Gln Gln Met Ser Tyr Ser Pro Trp Thr  
1 5

50 <210> 200  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 200

# ES 2 710 707 T3

Gln Gln Met Ser Tyr Thr Pro Trp Thr  
1 5

5  
<210> 201  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 201

Gln Gln Met Ser Tyr Val Pro Trp Thr  
1 5

15  
<210> 202  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 202

Gln Gln Met Thr Arg Val Pro Trp Thr  
1 5

25  
<210> 203  
<211> 9  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
35 <400> 203

Gln Gln Met Val Ile Ile Pro Trp Thr  
1 5

40  
<210> 204  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 204

Gln Gln Met Val Arg Glu Pro Trp Thr  
1 5

50  
<210> 205  
<211> 9  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

# ES 2 710 707 T3

<400> 205

Gln Gln Met Val Arg Ser Pro Trp Thr  
1 5

5

<210> 206  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

15

<400> 206

Gln Gln Met Val Arg Thr Pro Trp Thr  
1 5

20

<210> 207  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

30

<400> 207

Gln Gln Met Val Arg Val Pro Trp Thr  
1 5

35

<210> 208  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

45

<400> 208

Gln Gln Met Val Ser Ile Pro Trp Thr  
1 5

50

<210> 209  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

60

<400> 209

Gln Gln Met Tyr Gly Thr Pro Trp Thr  
1 5

65

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



# ES 2 710 707 T3

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

5 <400> 210

Gln Gln Met Tyr Lys Thr Pro Trp Thr  
1 5

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

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

15 <400> 211

Gln Gln Met Tyr Arg Thr Pro Trp Thr  
1 5

20 <210> 212  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 212

Gln Gln Asn Ala Phe Glu Pro Trp Thr  
1 5

30 <210> 213  
<211> 9  
<212> PRT  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

40 <400> 213

Gln Gln Asn Ala Phe Gly Pro Trp Thr  
1 5

45 <210> 214  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

50 <400> 214

Gln Gln Asn Ala Phe Ile Pro Trp Thr  
1 5

55 <210> 215  
<211> 9

# ES 2 710 707 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
5 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 215

Gln Gln Asn Ala Phe Ser Pro Trp Thr  
1 5

10 <210> 216  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 216

20 Gln Gln Asn Ala Phe Thr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 217  
<211> 9  
25 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

30 <400> 217

Gln Gln Asn Ala Phe Val Pro Trp Thr  
1 5

35 <210> 218  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 218

Gln Gln Asn Ala Tyr Ala Pro Trp Thr  
1 5

45 <210> 219  
<211> 9  
<212> PRT  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

55 <400> 219

# ES 2 710 707 T3

Gln Gln Asn Ala Tyr Gly Pro Trp Thr  
1 5

5  
<210> 220  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 220

Gln Gln Asn Ala Tyr Asn Pro Trp Thr  
1 5

15  
<210> 221  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 221

Gln Gln Asn Ala Tyr Ser Pro Trp Thr  
1 5

25  
<210> 222  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 222

Gln Gln Asn Phe Ile Ala Pro Trp Thr  
1 5

35  
<210> 223  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
<400> 223

Gln Gln Asn Met Ile Val Pro Trp Thr  
1 5

45  
<210> 224  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50  
<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

# ES 2 710 707 T3

<400> 224

Gln Gln Asn Arg Ile Ser Pro Trp Thr  
1 5

5

<210> 225  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

15

<400> 225

Gln Gln Asn Arg Ile Trp Pro Trp Thr  
1 5

20

<210> 226  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 226

Gln Gln Asn Arg Val Ile Pro Trp Thr  
1 5

30

<210> 227  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 227

40

Gln Gln Asn Arg Val Val Pro Trp Thr  
1 5

45

<210> 228  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 228

Gln Gln Asn Ser Tyr Ser Pro Trp Thr  
1 5

55

<210> 229  
<211> 9

# ES 2 710 707 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
5 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 229

Gln Gln Asn Val Ile Val Pro Trp Thr  
1 5

10 <210> 230  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 230

20 Gln Gln Asn Val Asn Val Pro Trp Thr  
1 5

<210> 231  
<211> 9  
25 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

30 <400> 231

Gln Gln Asn Tyr Lys Leu Pro Trp Thr  
1 5

35 <210> 232  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 232

Gln Gln Ser Ala Phe Val Pro Trp Thr  
1 5

45 <210> 233  
<211> 9  
<212> PRT  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

55 <400> 233

Gln Gln Ser Ala Tyr Ala Pro Trp Thr  
1 5

# ES 2 710 707 T3

<210> 234  
<211> 9  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

10 <400> 234

Gln Gln Ser Ala Tyr Ile Pro Trp Thr  
1 5

<210> 235  
<211> 9  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1L11

<400> 235

Gln Gln Ser Glu Ala Cys Pro Trp Thr  
1 5

25 <210> 236  
<211> 9  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 236

35 <210> 237  
<211> 9  
<212> PRT  
40 <213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 237

Gln Gln Ser Lys Thr Val Pro Trp Thr  
1 5

50 <210> 238  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 238

# ES 2 710 707 T3

Gln Gln Thr Ala Phe Gly Pro Trp Thr  
1 5

5 <210> 239  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
  
<400> 239

Gln Gln Thr Ala Phe Ser Pro Trp Thr  
1 5

15 <210> 240  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
  
<400> 240

25 Gln Gln Thr Ala Tyr Ala Pro Trp Thr  
1 5

30 <210> 241  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
  
<400> 241

Gln Gln Thr Ala Tyr Ser Pro Trp Thr  
1 5

40 <210> 242  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11  
  
<400> 242

Gln Gln Thr Arg Arg Thr Pro Trp Thr  
1 5

50 <210> 243  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>

# ES 2 710 707 T3

<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 243

5 Gln Gln Thr Ser Phe Ala Pro Trp Thr  
1 5

<210> 244

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

15 <400> 244

Gln Gln Val Ala Tyr Ser Pro Trp Thr  
1 5

<210> 245

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia aleatorizada de CDRL3 de hz1E11

<400> 245

Gln Gln Val Phe Ala Ile Pro Trp Thr  
1 5

<210> 246

30 <211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de hz1E11-3

<400> 246

40

```

gatatccaga tgacacaaag cccatcatct ttatctgcc a gctggggaga tagagtgacc 60
atcacatgtc tggcatcaca gaccatcgga acttggttgg cctggtacca gcaaaaacca 120
ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgtc gcaacgagtc tcgctgacgg tgtgccttcc 180
agattttccg gttccggcag cggcacagac ttactctga caattagttc cctgcagccc 240
gaggacttcg ctacttatta ctgcgaccag atgtacagca cggcctggac cttcgggcag 300
gggaccaaag ttgaaataaa g 321
    
```

<210> 247

45 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de hz1E11-3

<400> 247



# ES 2 710 707 T3

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

5     <210> 248  
       <211> 321  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

10    <220>  
       <223> Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de hz1E11-133  
       <400> 248

```

gatatccaga tgacacaaag cccatcatct ttatctgccca gcgtgggaga tagagtgacc      60
atcacatgtc tggcatcaca gaccatcggg acttggttgg cctggtacca gcaaaaacca      120
ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgtc gcaacgagtc tgcctgacgg tgtgccttcc      180
agattttcgg gttccggcag cggcacagac ttactctga caattagttc cctgcagccc      240
gaggacttcg ctacttatta ctgccagcag aatgcttatg cgccctggac cttcgggcag      300
gggaccaaag ttgaaataaa g                                     321
  
```

15    <210> 249  
       <211> 107  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial

20    <220>  
       <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de hz1E11-133

25    <400> 249

ES 2 710 707 T3

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

5 <210> 250  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de hz1E11-154  
 <400> 250

gatatccaga tgacacaaag cccatcatct ttatctgccca gcgtgggaga tagagtgacc 60  
 atcacatgic tggcatcaca gaccatcgga acttgggtgg cctggtacca gcaaaaacca 120  
 ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgic gcaacgagtc tcgctgacgg tgtgccttcc 180  
 agattttccg gttccggcag cggcacagac ttactctga caattagltc cctgcagccc 240  
 gaggacttcg ctacttatta ctgccagcag acggcctttt ctccctggac cttcgggcag 300  
 gggaccāaag ttgaaataaa g 321

15 <210> 251  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de hz1E11-154  
 <400> 251

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

25

# ES 2 710 707 T3

Tyr Val Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ala Phe Ser Pro Trp  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- 5
- (i) una región variable de cadena pesada que comprende una región determinante de complementariedad (CDR)H1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6;
- 10
- (ii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:218;
- (iii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:239;
- 15
- (iv) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:88;
- (v) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:76 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6;
- 20
- (vi) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:43 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6;
- (vii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:84 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6;
- 25
- (viii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:85 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6;
- 30
- (ix) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:76 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:222;
- (x) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:67 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:156;
- 35
- (xi) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:109;
- (xii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:76 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:157;
- 40
- (xiii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:67 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:154;
- 45
- (xiv) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:220;
- (xv) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:64 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:178;
- 50
- (xvi) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:64 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6;
- (xvii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:71 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:155;
- 55
- (xviii) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:131;
- 60
- (xix) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:71 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6 o
- (xx) una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRH2 de SEQ ID NO:2 y CDRH3 de SEQ ID NO:83 y una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 de SEQ ID NO:4, CDRL2 de SEQ ID NO:5 y CDRL3 de SEQ ID NO:6.
- 65

2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en la prevención o el tratamiento de un cáncer.
- 5 3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está en combinación con trastuzumab.
- 10 4. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de un cáncer, que comprende: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo contra HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la composición comprende además trastuzumab.
- 20 6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en los que el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de bronquios, cáncer nasofaríngeo, cáncer de laringe, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer de hueso, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides o cáncer ureteral, preferentemente cáncer de mama o cáncer de estómago.
- 25 7. Una composición farmacéutica para su uso en la inducción de apoptosis, que comprende: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo contra HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición farmacéutica induce apoptosis para la prevención o el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa; en la que la enfermedad hiperproliferativa es cáncer, hiperplasia, queloide, síndrome de Cushing, aldosteronismo primario, eritroplasia, policitemia vera, leucoplasia, cicatriz hiperplásica, liquen plano, lentiginosis, arteriosclerosis, aterosclerosis, reestenosis o estenosis.
- 35 9. Un kit para su uso en el diagnóstico de un cáncer que comprende el anticuerpo contra HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.
10. Una composición farmacéutica que comprende: (a) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además trastuzumab.

Fig. 1

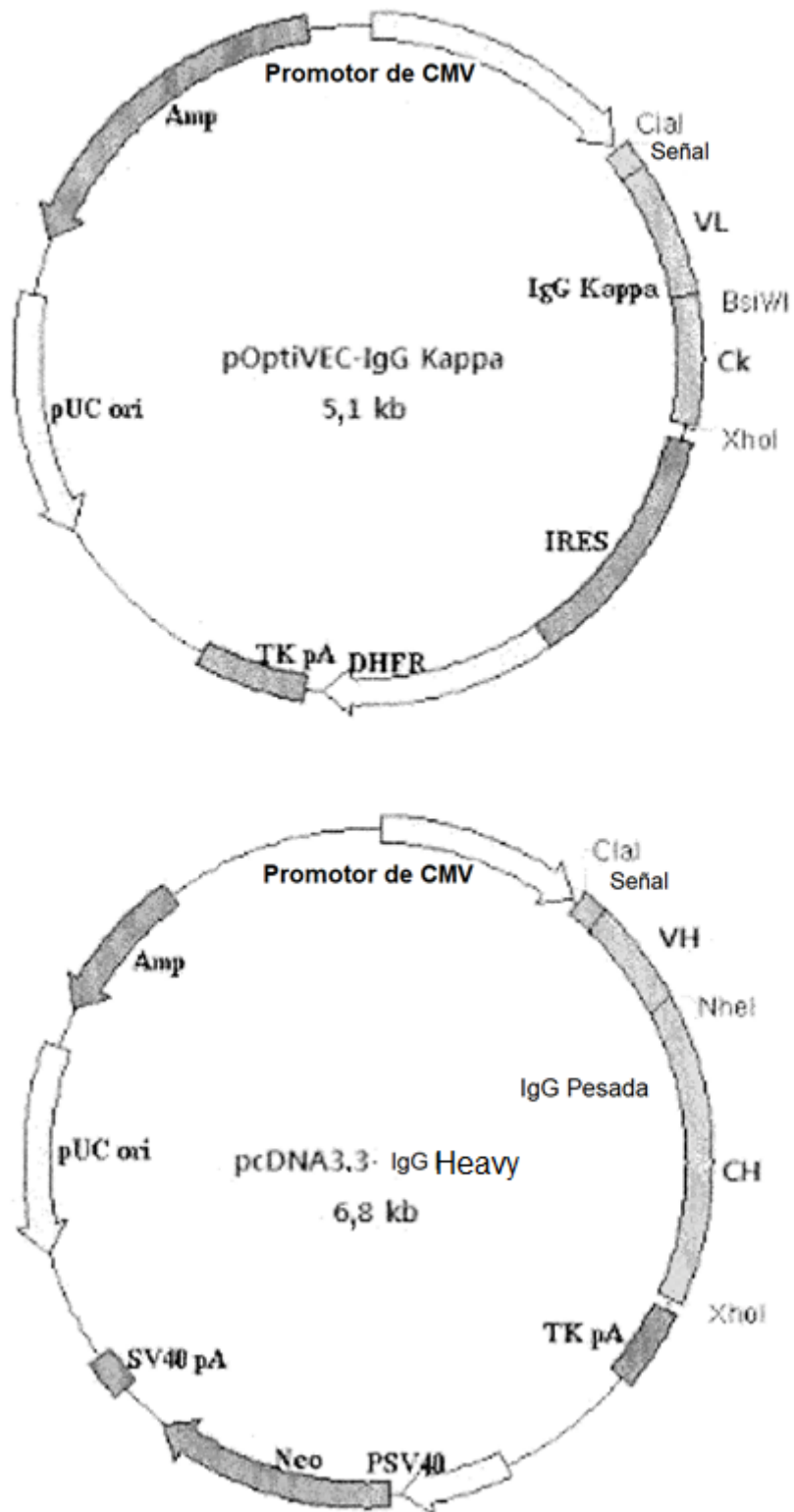


Fig. 2a

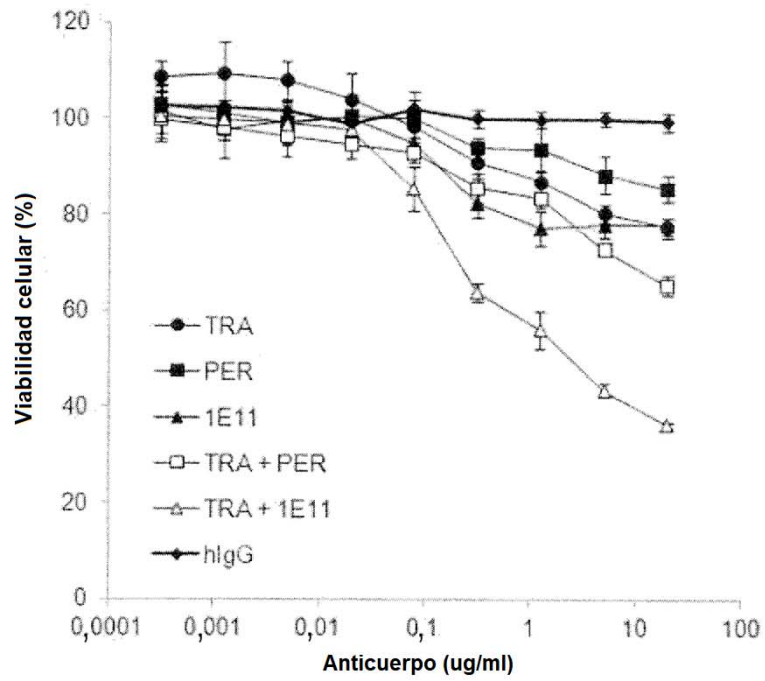
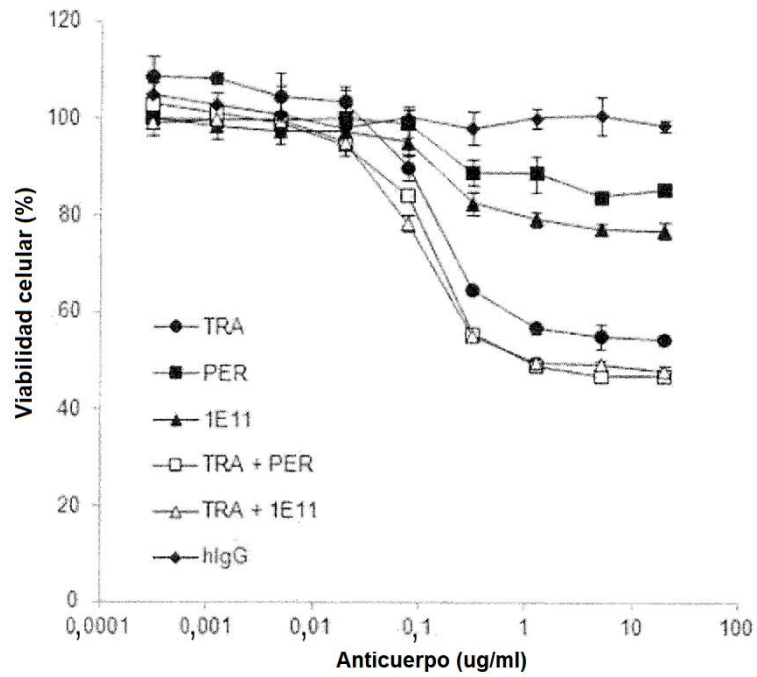
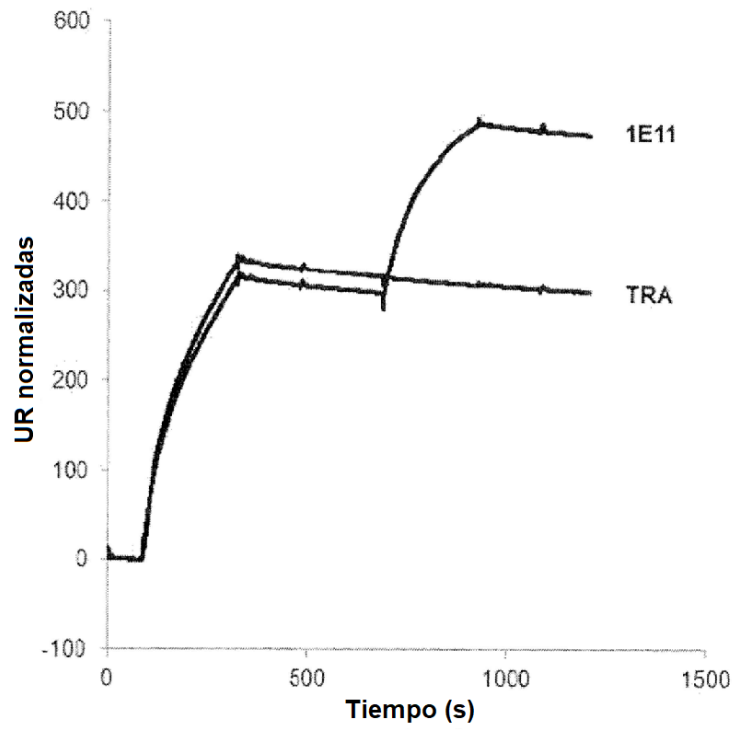


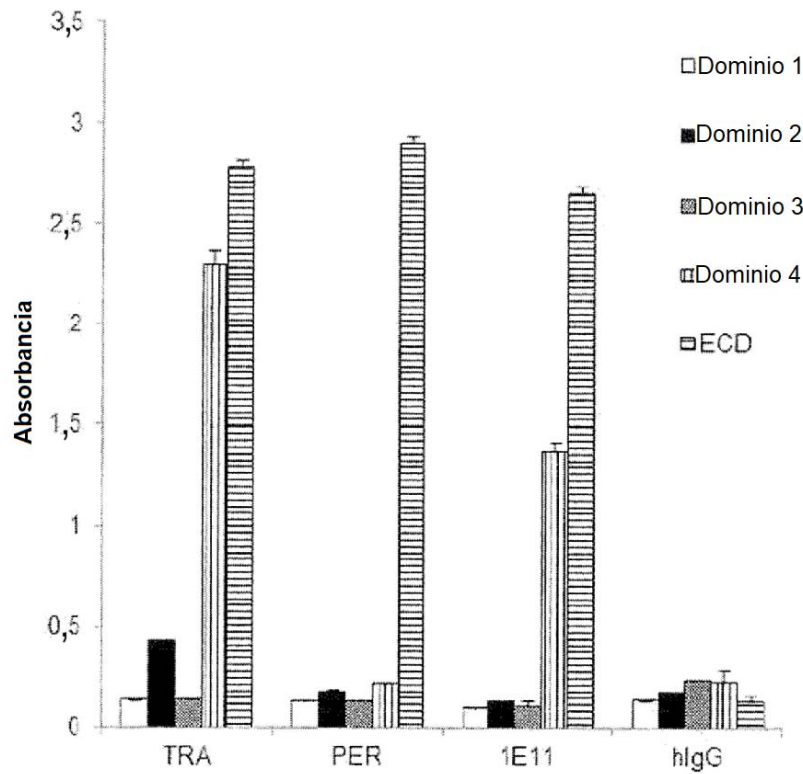
Fig. 2b



**Fig. 3a**

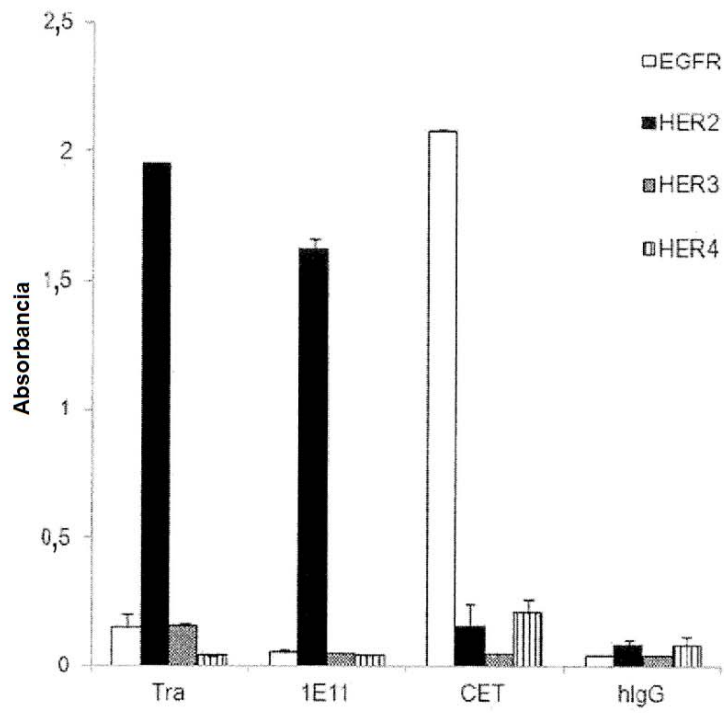


**Fig. 3b**

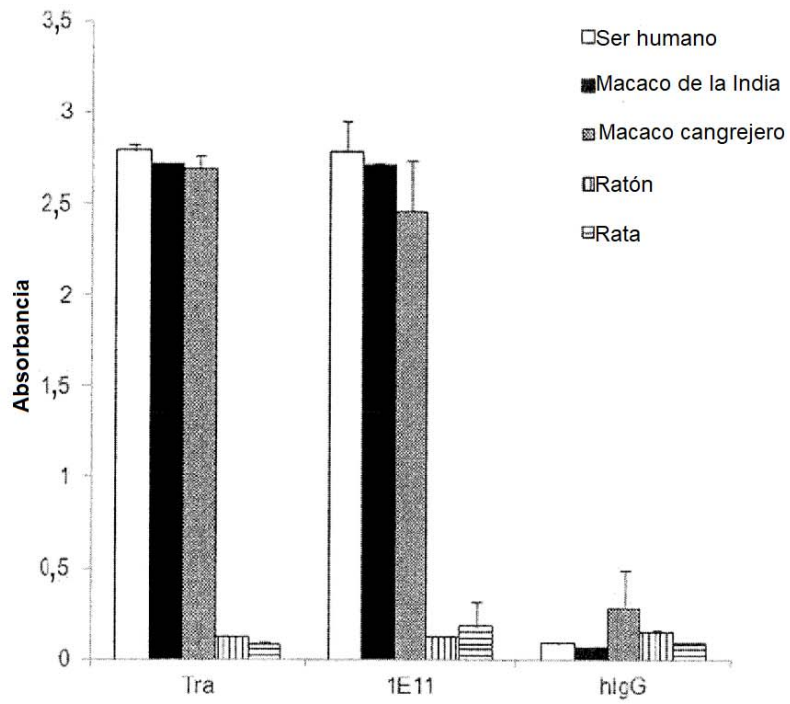




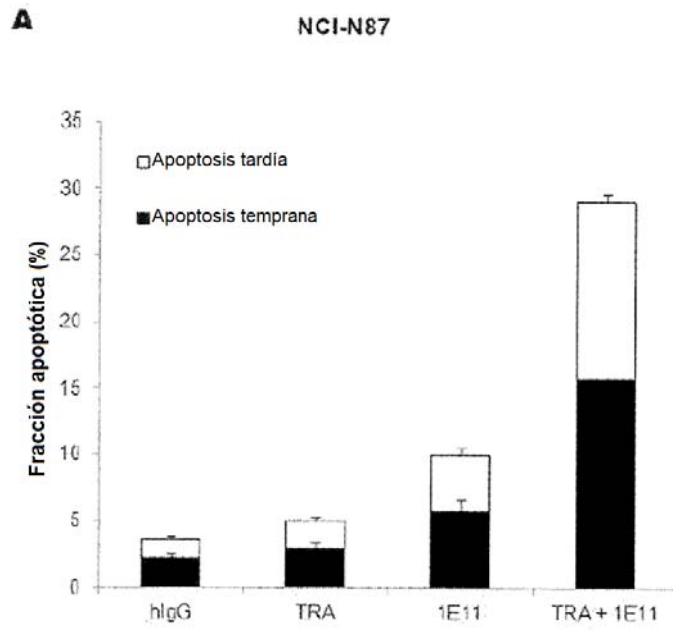
**Fig. 4a**



**Fig. 4b**



**Fig. 5a**



**Fig. 5b**

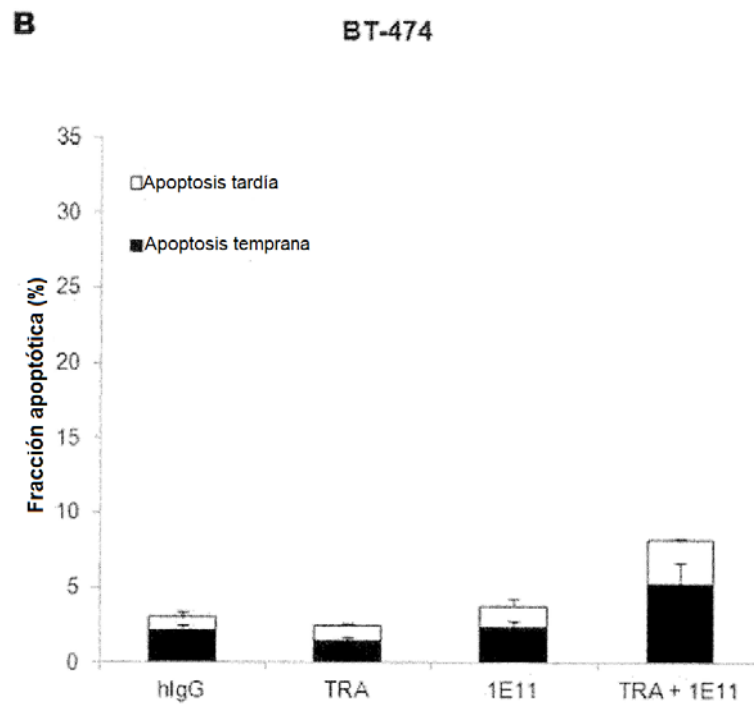


Fig. 5c

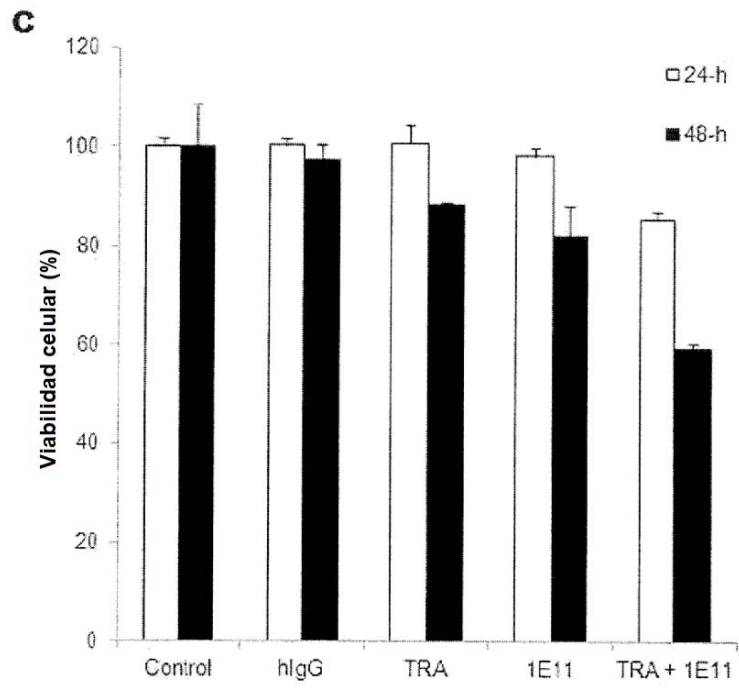


Fig. 5d

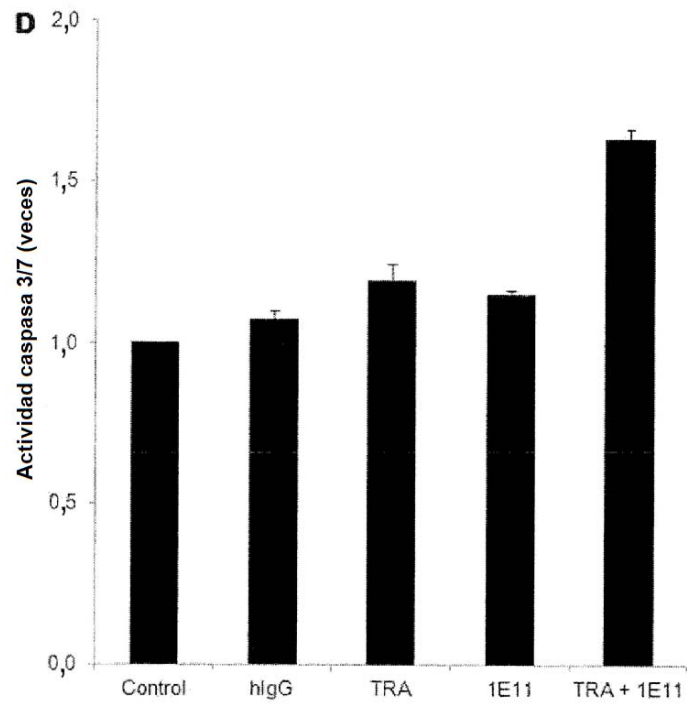
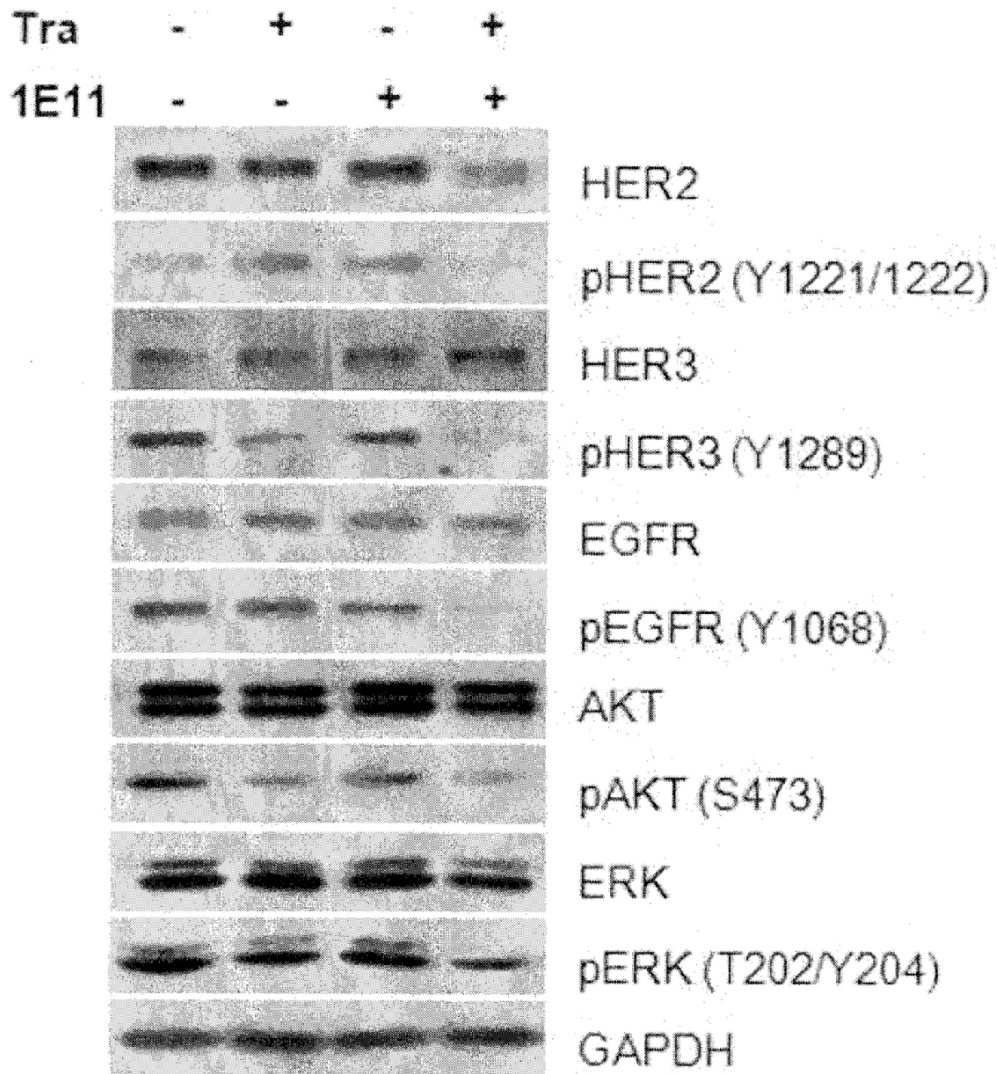
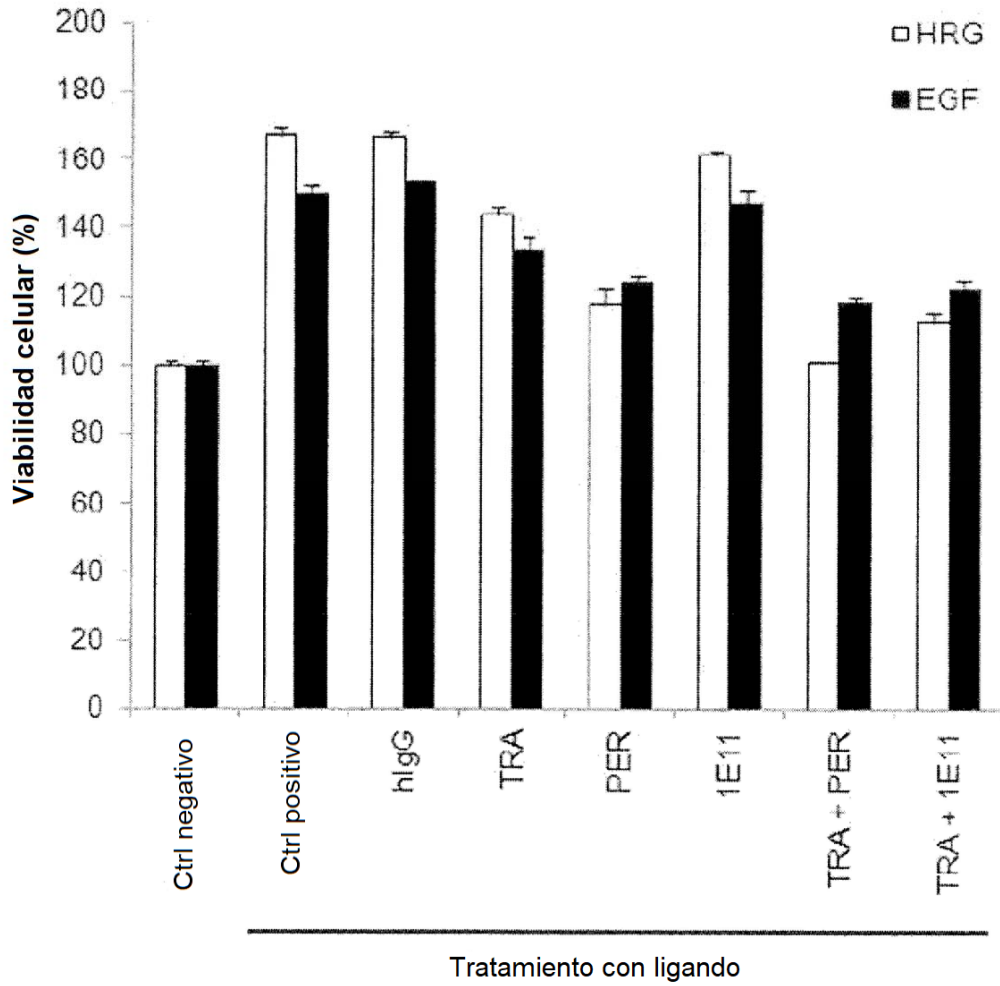


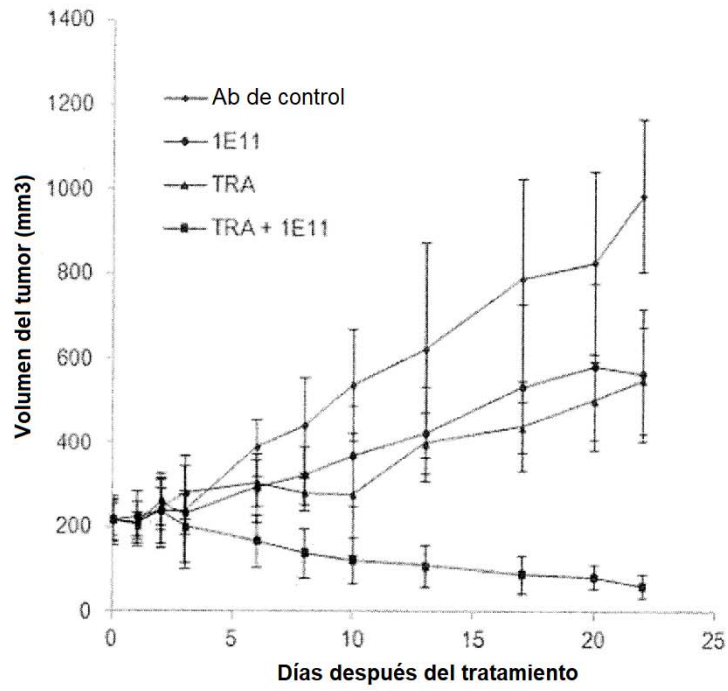
Fig. 6a



**Fig. 6b**



**Fig. 7a**



**Fig. 7b**

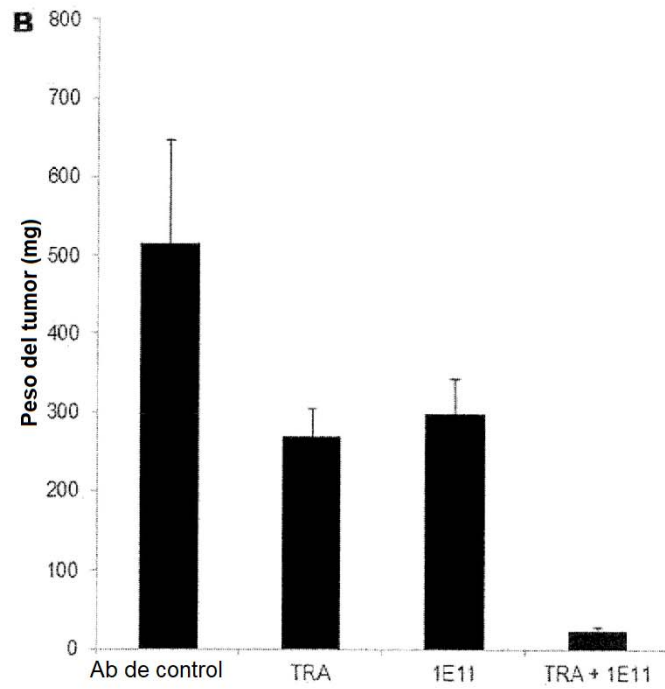
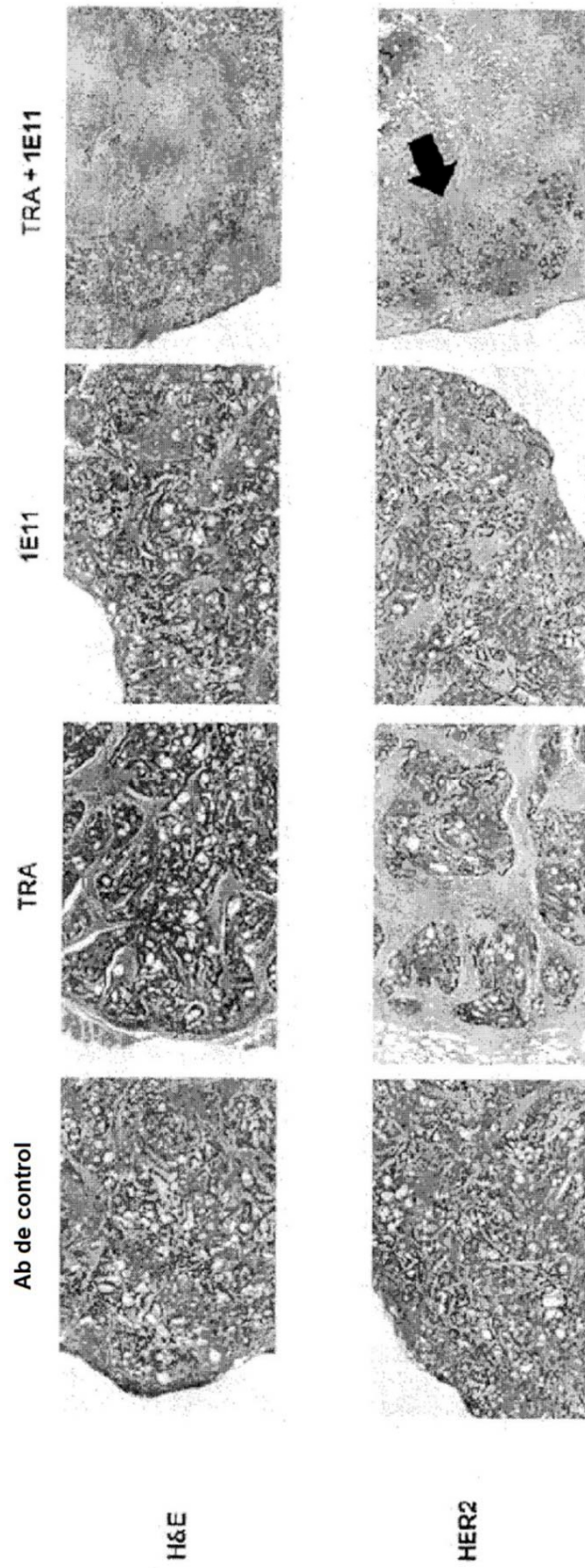
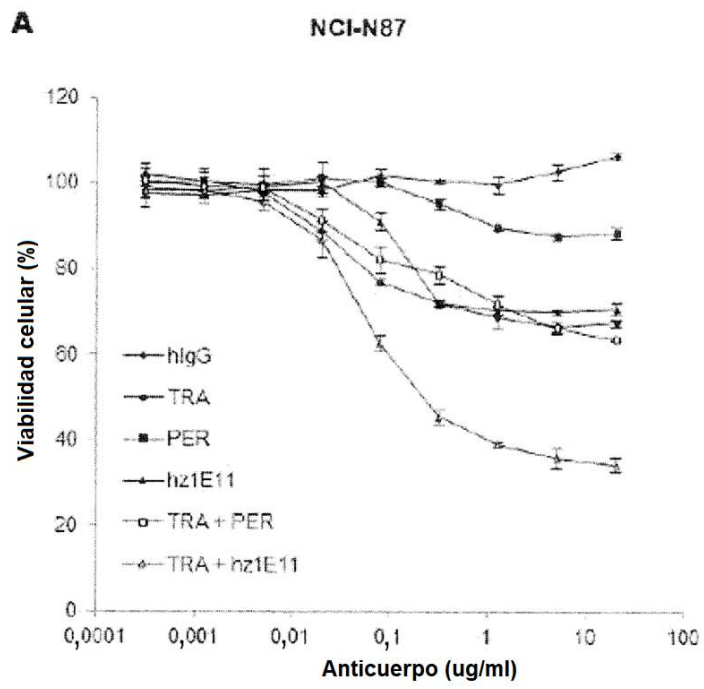


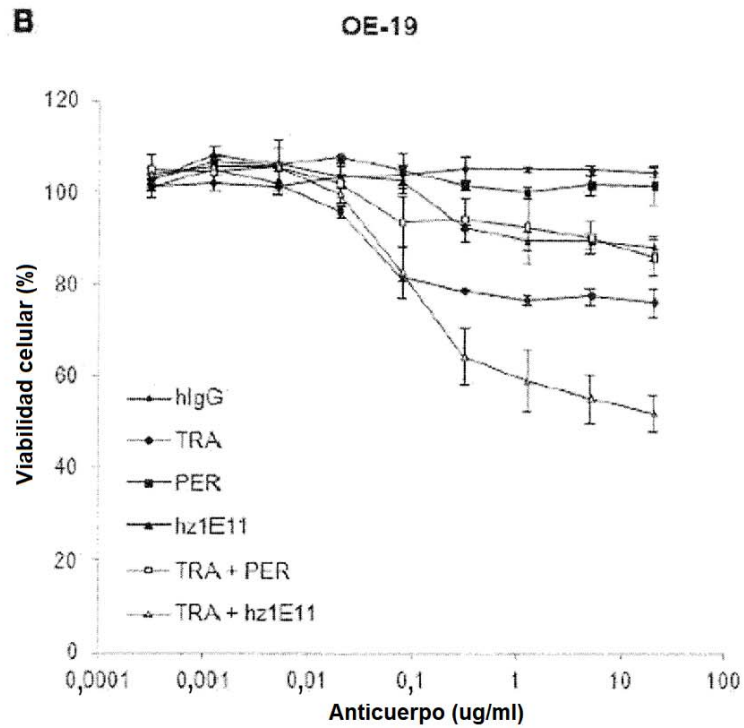
Fig. 7c



**Fig. 8a**



**Fig. 8b**





**Fig. 9**

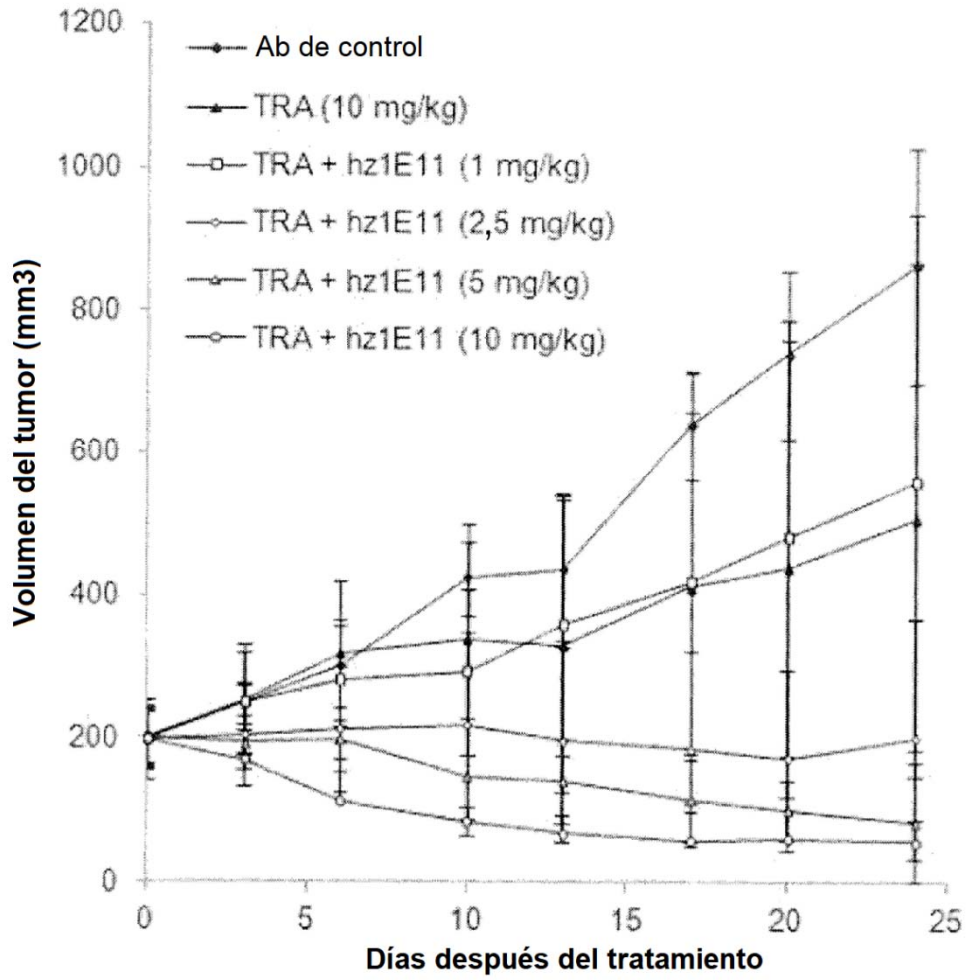


Fig. 10a

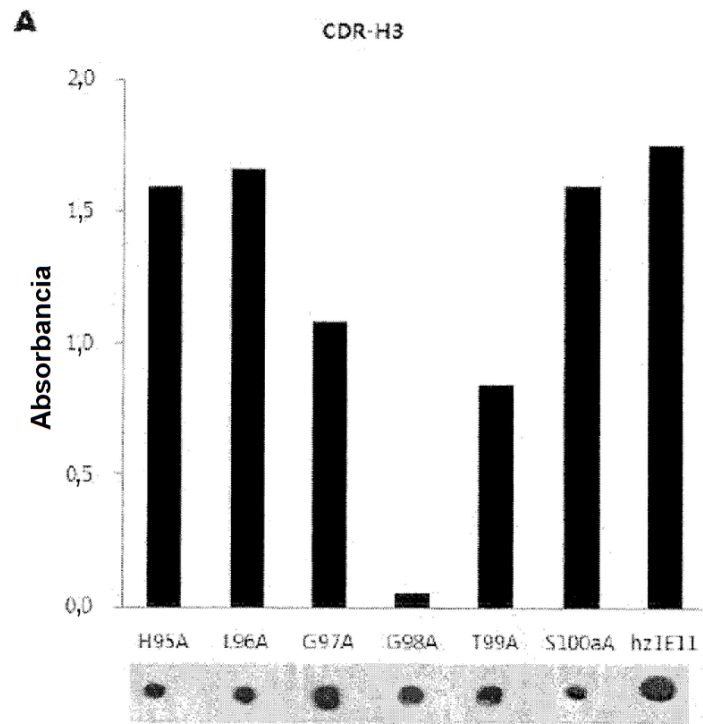
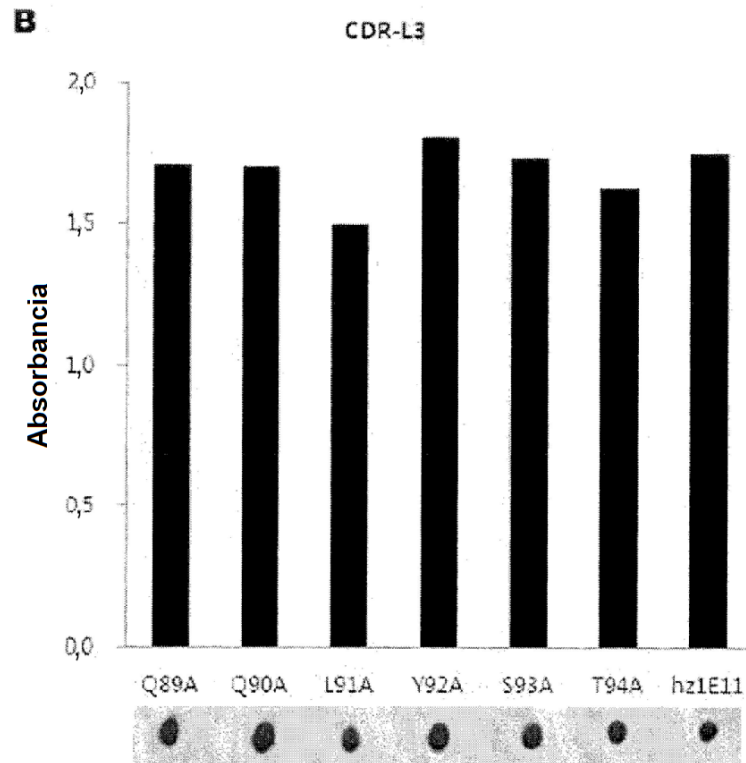
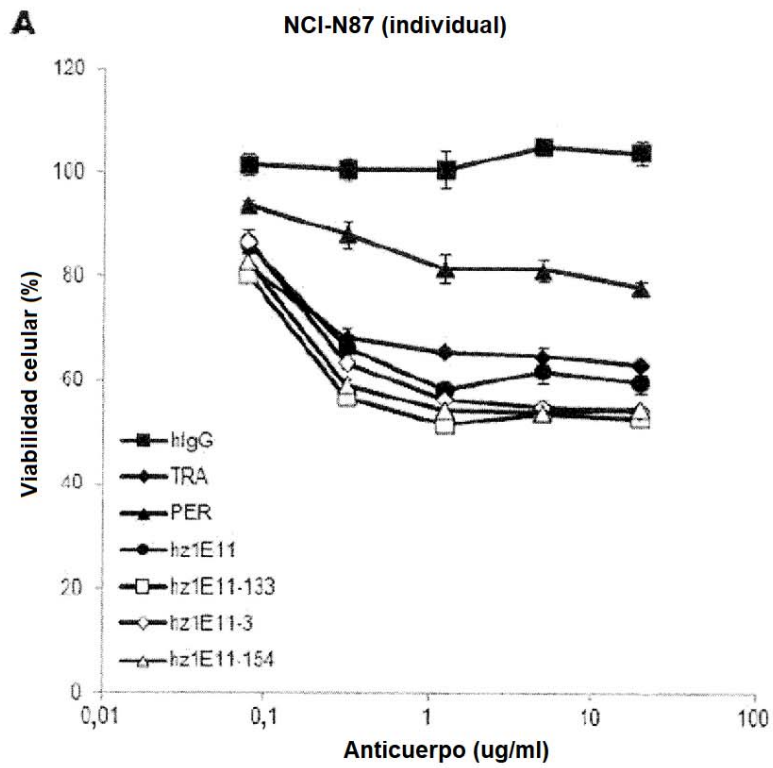


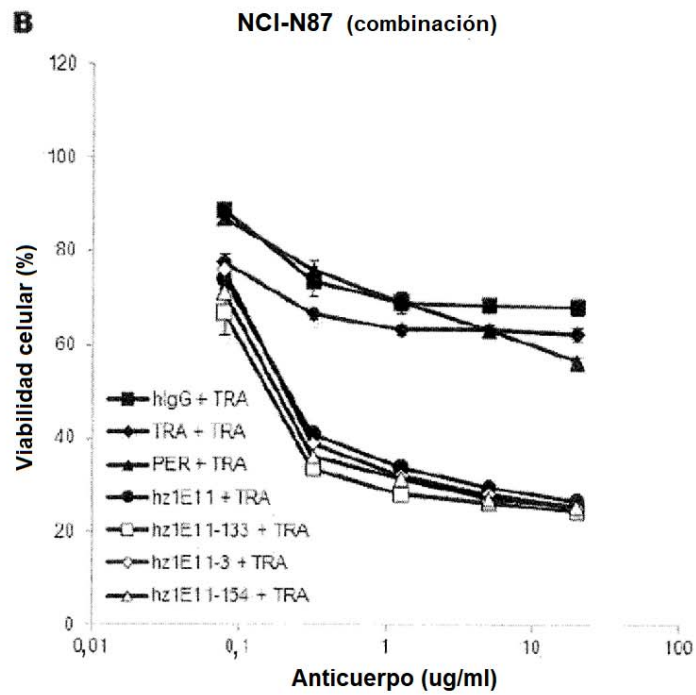
Fig. 10b

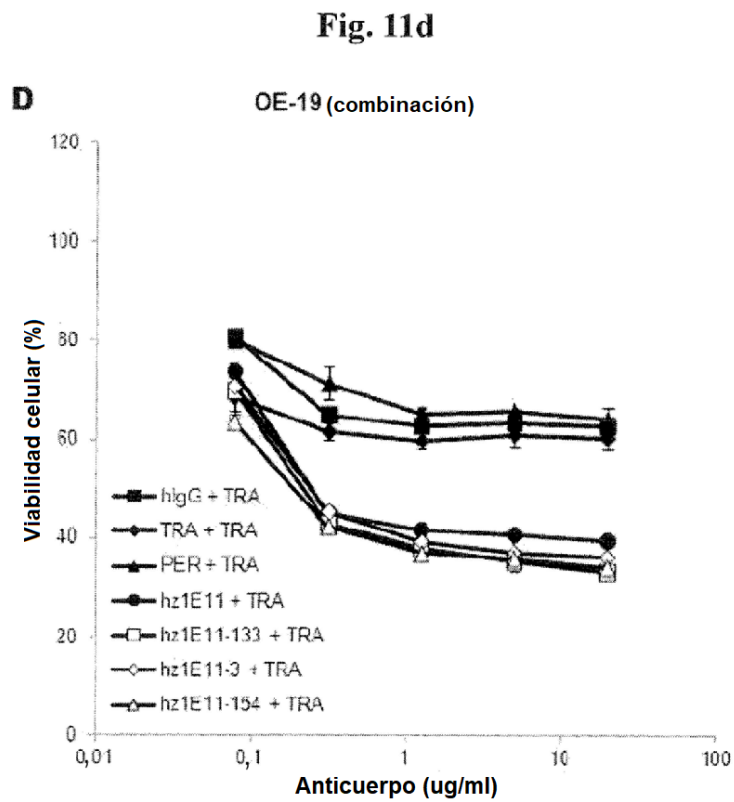
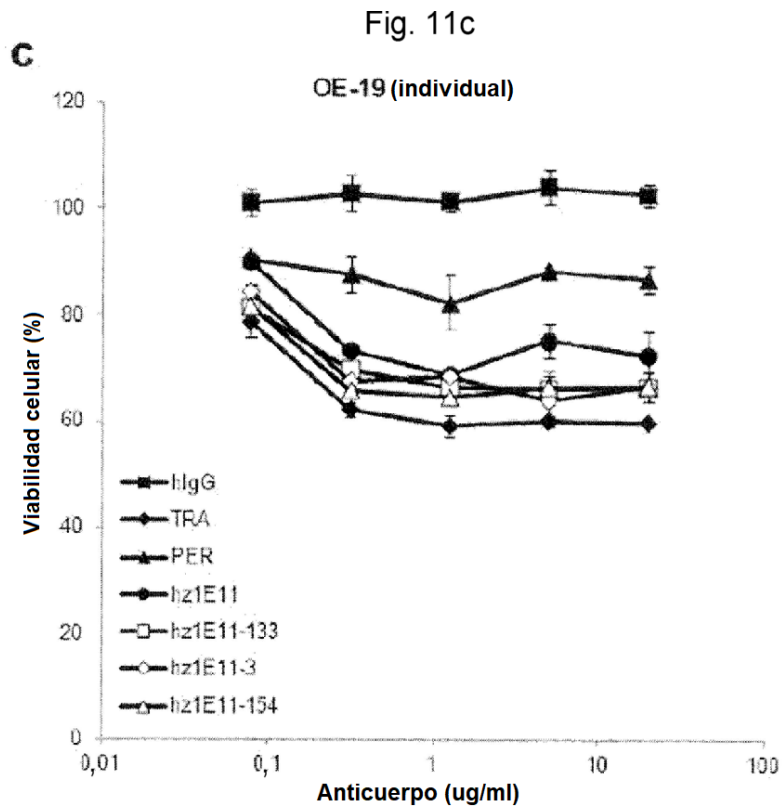


**Fig. 11a**

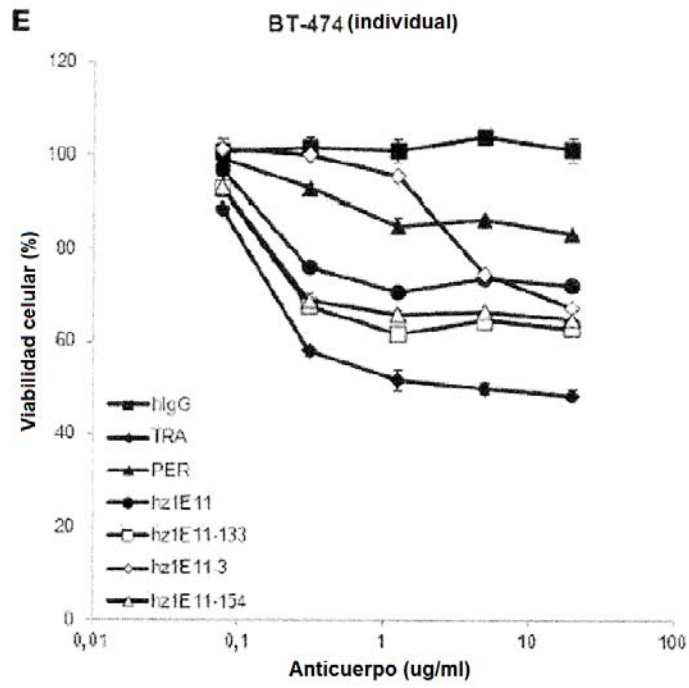


**Fig. 11b**





**Fig. 11e**



**Fig. 11f**

