

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 821**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2011 PCT/EP2011/058772**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11147982**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011 E 11723427 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2575880**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra epítipo HER2**

30 Prioridad:

27.05.2010 US 349182 P
27.05.2010 DK 201000468

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2019

73 Titular/es:

GENMAB A/S (100.0%)
Kalvebod Brygge 43
1560 Copenhagen V, DK

72 Inventor/es:

GOEIJ, BART DE;
BRINK, EDWARD N. VAN DEN;
HAIJ, SIMONE;
RIEDL, THILO;
HOET, RENÉ;
BAADSGAARD, OLE;
SATIJN, DAVID;
WINKEL, JAN VAN DE y
PARREN, PAUL

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 718 821 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra epítipo HER2

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales dirigidos al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y a los usos de dichos anticuerpos, en particular a su uso en el tratamiento del cáncer.

10 **Antecedentes de la invención**

HER2 es un receptor tirosina cinasa de la superficie celular de 185 kDa y miembro de la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, de sus siglas en inglés) que comprende cuatro receptores distintos: EGFR/ErbB-1, HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 y HER4/ErbB-4. Tanto los homodímeros como los heterodímeros están formados por los cuatro miembros de la familia EGFR, siendo HER2 el compañero de dimerización preferido y más potente para otros receptores ErbB (Graus-Porta et al., *Embo J* 1997;16:1647-1655; Tao et al., *J Cell Sci* 2008;121:3207-3217). HER2 se puede activar mediante sobreexpresión o mediante heterodimerización con otros ErbB que se pueden activar mediante la unión de ligandos (Riese y Stern, *Bioessays* 1998; 20:41-48). En el caso de HER2, no se ha identificado ningún ligando. La activación de HER2 conduce a la fosforilación del receptor, que desencadena una cascada de señales cadena abajo a través de múltiples vías de señalización, tales como MAPK, fosfoinositol 3-cinasa/AKT, JAK/STAT y PKC, lo que finalmente da como resultado la regulación de múltiples funciones celulares, tales como crecimiento, supervivencia y diferenciación (Huang et al., *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9:97-110).

Gran parte de la atención sobre HER2 en tumores se ha centrado en su papel en el cáncer de mama, en el que se informa sobre la sobreexpresión de HER2 en aproximadamente el 20 % de los casos y se correlaciona con un mal pronóstico (Reese et al., *Stem Cells* 1997;15:1-8; Andrechek et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3444-3449; y Slamon et al., *Science* 1987;235:177-182). Además del cáncer de mama, la expresión de HER2 también se ha asociado con otros tipos de carcinoma humano, incluyendo cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de esófago y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (García de Palazzo et al., *Int J Biol Markers* 1993;8:233-239; Ross et al., *Oncologist* 2003;8:307-325; Osman et al., *J Urol* 2005;174:2174-2177; Kapitanovic et al., *Gastroenterology* 1997;112:1103-1113; Turken et al., *Neoplasma* 2003;50:257-261; y Oshima et al., *Int J Biol Markers* 2001;16:250-254).

Trastuzumab (Herceptin®) es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante dirigido contra el dominio IV de la proteína HER2, que bloquea así la homodimerización de HER2 independiente del ligando y, en menor medida, la heterodimerización de HER2 con otros miembros de la familia en células con una alta sobreexpresión de HER2 (Cho et al., *Nature* 2003;421:756-760 y Wehrman et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:19063-19068). En células con niveles modestos de expresión de HER2, se encontró que el trastuzumab inhibe la formación de heterodímeros HER2/EGFR (Wehrman et al., (2006), *citado anteriormente*; Schmitz et al., *Exp Cell Res* 2009;315:659-670). Trastuzumab media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, de sus siglas en inglés) y previene el desprendimiento de ectodominio, que de otro modo daría lugar a la formación de una proteína constitutivamente activa truncada en células que sobreexpresan HER2. También se ha informado de la inhibición de la proliferación tanto *in vitro* como *in vivo* de células tumorales que expresan altos niveles de HER2 para el trastuzumab (revisado en Nahta y Esteva, *Oncogene* 2007; 26:3637-3643). Herceptin® ha sido aprobado para el tratamiento de primera línea y adyuvante del cáncer de mama metastásico que sobreexpresa HER2, ya sea en combinación con quimioterapia, o como un solo agente después de uno o más regímenes de quimioterapia. Se ha encontrado que el trastuzumab es eficaz solo en el 20-50 % de los pacientes con tumores mamarios que sobreexpresan HER2 y muchos de los que respondieron inicialmente muestran una recaída después de unos pocos meses (Dinh et al., *Clin Adv Hematol Oncol* 2007; 5:707-717).

El Pertuzumab (Omnitarg™) es otro anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el dominio II de la proteína HER2, que da como resultado la inhibición de la heterodimerización inducida por ligando (es decir, la dimerización de HER2 con otro miembro de la familia ErbB al que se une un ligando); un mecanismo informado de que no requiere estrictamente altos niveles de expresión de HER2 (Franklin et al., *Cancer Cell* 2004; 5:317-328). Aunque el pertuzumab también media en la ADCC, el principal mecanismo de acción del pertuzumab se basa en su bloqueo de la dimerización (Hughes et al., *Mol Cancer Ther* 2009; 8:1885-1892). Por otra parte, se encontró que el pertuzumab aumenta la internalización y la regulación por disminución de EGFR mediante la inhibición de la formación de heterodímeros EGFR/HER2, que de otro modo atan los EGFR en la membrana plasmática (Hughes et al., 2009, *citado anteriormente*). Esto se correlaciona con la observación de que los homodímeros de EGFR se internalizan más eficazmente que los dímeros de EGFR/HER2 (Pedersen et al., *Mol Cancer Res* 2009; 7:275-284). Los mecanismos de acción complementarios de pertuzumab y trastuzumab dan como resultado, según se informa, eficacia y efectos antitumorales mejorados cuando se combinan en pacientes que progresaron durante la terapia previa con trastuzumab (Baselga et al., *J Clin Oncol* 2010; 28:1138-1144), y se lleva a cabo un ensayo de fase III para evaluar esta combinación de anticuerpos junto con Docetaxel en cáncer de mama metastásico positivo para HER2 no tratado previamente.

Un enfoque alternativo para mejorar la terapia con anticuerpos dirigidos es mediante el suministro de células o fármacos citotóxicos específicamente a las células cancerosas que expresan el antígeno. Por ejemplo, los llamados anticuerpos trifuncionales son anticuerpos biespecíficos, que se dirigen con un brazo al antígeno en la célula tumoral y con el otro brazo, por ejemplo, a CD3 en linfocitos T. Al unirse, se forma un complejo de linfocitos T, células tumorales y células efectoras que se unen a Fc, lo que lleva a la destrucción de las células tumorales (Muller y Kontermann, *BioDrugs* 2010; 24:89-98.). Ertumaxomab es uno de estos anticuerpos trifuncionales contra HER2, que induce citotoxicidad en líneas celulares con baja expresión de HER2 y que se encuentra en desarrollo clínico de Fase II en cáncer de mama metastásico (Jones et al., *Lancet Oncol* 2009; 10:1179-1187 y Kiewe et al., *Clin Cancer Res* 2006;12:3085-3091).

Un conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC, de sus siglas en inglés) HER2 se encuentra actualmente en desarrollo clínico. T-DM1 consiste en trastuzumab conjugado con la toxina fúngica maitansina. En los ensayos de Fase II, se informaron las respuestas en una cohorte de pacientes pretratada en exceso que incluía terapia previa con trastuzumab y/o lapatinib (Krop et al., *J Clin Oncol*. 2010 (publicado en línea antes de imprimir) y Lewis Phillips et al., *Cancer Res* 2008;68:9280-9290). Se está realizando un ensayo de Fase III para evaluar la eficacia y la seguridad de T-DM1 frente a capecitabina + lapatinib en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico positivo para HER2 que recibieron tratamiento previo con trastuzumab.

Si bien están involucrados muchos factores en la selección de un anticuerpo adecuado para la terapia dirigida a HER2, normalmente es una ventaja para un enfoque de ADC si el complejo HER2-anticuerpo se internaliza de manera eficaz tras la unión al anticuerpo. Los estudios sobre anticuerpos HER2 murinos han demostrado que ciertas combinaciones de anticuerpos instigan la endocitosis del HER2 (Ben-Kasus et al., *PNAS* 2009;106:3294-9). Se ha informado que los anticuerpos F5 y C1 del HER2 humano se internalizan relativamente rápido por sí mismos y se unen al mismo epítipo (documentos WO 99/55367 y WO 2006/116107). En comparación con EGFR, sin embargo, la internalización de HER2 está dañada. De hecho, los homodímeros de EGFR se internalizan mucho más eficazmente que los homodímeros de HER2 (Dinh et al., *Clin Adv Hematol Oncol* 2007; 5:707-717). EGFR, y también HER3, pueden aumentar la endocitosis de HER2 mediante la formación de heterodímeros EGFR/HER2 y HER3/HER2, respectivamente (Baulida et al., *J Biol Chem* 1996; 271:5251-5257; Pedersen NM, et al., *Mol Cancer Res* 2009;7:275-84).

Rockbjerg et al., *Molecular Oncology* 2009; 3, 238-247 desvela anticuerpos específicos para HER2 dirigidos a unir epítopos diferentes de los reconocidos por trastuzumab y pertuzumab, permitiendo así potencialmente una mejor selección simultánea de epítopos separados y distintos. Se ha demostrado que los anticuerpos que se unen a los epítopos LPESFDGD o LQVF dentro del dominio 3 aportan inhibición del crecimiento.

El documento WO 2008/019290 desvela anticuerpos específicos de ErbB2 completamente humanos producidos en *XenoMouse*. Los anticuerpos inhiben la fosforilación de ErbB2, muy probablemente mediante el bloqueo de la heterodimerización del receptor o la inducción de la regulación por disminución del receptor. Ninguno de los anticuerpos bloquea la unión de ErbB2 a 2C4 o trastuzumab, lo que sugiere que los anticuerpos pertenecen a un intervalo de epítopos diferente.

Los complejos mecanismos que regulan la función de HER2 merecen una mayor investigación sobre estrategias terapéuticas nuevas y optimizadas contra este protooncogén. Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de productos eficaces y seguros para tratar enfermedades relacionadas con HER2, tal como cáncer.

Sumario de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar nuevos anticuerpos monoclonales HER2 altamente específicos y eficaces para uso médico. Los anticuerpos de la invención exhiben características de unión a HER2 que difieren de los anticuerpos descritos en la materia. En particular, los anticuerpos de la invención se unen a un segmento diferente de HER2, en el sentido de que se bloquean entre sí pero no con trastuzumab, pertuzumab o F5/C1 de la unión a HER2. Además, a diferencia de los anticuerpos conocidos, los anticuerpos de la invención se pueden internalizar eficazmente en células que expresan HER2 sin promover la proliferación celular.

Los anticuerpos pueden ser completamente humanos, unirse a nuevos epítopos y/o tener otras propiedades favorables para su uso terapéutico en pacientes humanos. Las propiedades ejemplares incluyen, aunque no de forma limitativa, características de unión favorables a células cancerosas que expresan HER2 humano en niveles altos o bajos, unión específica a células epiteliales Rhesus que expresan un ortólogo de HER2, internalización eficaz tras la unión a HER2, alta capacidad para destruir células cancerosas que expresan niveles altos o bajos de HER2 cuando se administran como un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC), sin efecto agonista importante en la proliferación de células cancerosas que expresan HER2, y proporcionan una destrucción eficaz de las células que expresan HER2 mediada por ADCC, así como cualquier combinación de las propiedades anteriores.

Estos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Alineación de las secuencias de la región variable de la cadena pesada (VH) del HuMab con las secuencias (A-D) de la línea germinal (referencia). En cada secuencia VH, se resaltan los aminoácidos que difieren de los de la línea germinal (referencia) en posiciones específicas. Se muestran las secuencias VH consenso, donde "X" indica las posiciones en las que son posibles los aminoácidos alternativos (seleccionados de aquellos alineados en la posición indicada). Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas en cada secuencia VH. Las secuencias CDR consenso se definen con más detalle en la Tabla 4.

Figura 2: Alineación de las secuencias de la región variable de la cadena ligera (VL) del HuMab con las secuencias (AB) de la línea germinal (referencia). En cada secuencia VL, se resaltan los aminoácidos que difieren de los de la línea germinal (referencia) en posiciones específicas. En la Figura 2A, todas las secuencias VL procedían del mismo segmento V (IgKV3-20-01), pero el segmento J más cercano difería entre los anticuerpos. Se muestran las secuencias VL consenso, donde "X" indica las posiciones en las que son posibles los aminoácidos alternativos (seleccionados de aquellos alineados en la posición indicada). Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas en cada secuencia VL. Las secuencias CDR consenso se definen con más detalle en la Tabla 4.

Figura 3: Curvas de unión de anticuerpos HER2 a líneas celulares que expresan HER2 (A) altas (AU565) y (B) bajas (A431), determinadas como se describe en el Ejemplo 12. Los datos mostrados son las intensidades medias de fluorescencia (MFI, de sus siglas en inglés) de un experimento representativo para cada línea celular. Los valores EC_{50} indican las afinidades aparentes.

Figura 4: Unión de anticuerpos HER2 a HER2 expresados en células epiteliales de Rhesus. Los datos mostrados son las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de un experimento, descrito en el Ejemplo 13.

Figura 5: Ensayo de liberación de cromo (ADCC) de anticuerpos HER2, que muestra la lisis mediada por PBMC de células SK-BR-3 marcadas con ^{51}Cr después de la incubación con anticuerpo HER2. Los valores representados son los porcentajes máximos medios de liberación de $^{51}Cr \pm$ la desviación estándar de un experimento de ADCC *in vitro* representativo con células SK-BR-3. Véase el Ejemplo 15 para obtener detalles.

Figura 6: Efecto de los anticuerpos HER2 sobre la proliferación de células AU565, en comparación con células no tratadas (establecido al 100 %). Los datos que se muestran son porcentajes de proliferación de células AU565 en comparación con células no tratadas medidas en tres experimentos independientes \pm la desviación estándar. Véase el Ejemplo 16 para obtener detalles.

Figura 7: Ensayo ADC, que muestra la destrucción de las células AU565 (A) o de las células A431 (B) a través de anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA'. (A) Los datos que se muestran son las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de un experimento representativo con células AU565 tratadas con anticuerpos HER2 no conjugados y conjugados con anti-kappa-ETA'. (B) Los datos que se muestran son las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de un experimento representativo con células A431 tratadas con anticuerpos HER2 no conjugados y conjugados con anti-kappa-ETA'. Véase el Ejemplo 17 para obtener detalles.

Figura 8: Anticuerpo inducido por modulación por disminución de HER2. Porcentaje relativo de HER2 expresado en lisado de células AU565 después de 3 días de incubación con 10 $\mu g/ml$ de anticuerpo. La cantidad de HER2 se cuantificó utilizando un ELISA de captura específico de HER2 y se representó como un porcentaje con respecto a las células no tratadas. Los datos mostrados son la media de tres experimentos \pm desviación estándar. Véase el Ejemplo 19 para obtener detalles.

Figura 9: Análisis de colocación de anticuerpos HER2 (FITC) con el marcador lisosomal LAMP1 (Cy5), que muestra la intensidad de los píxeles de FITC superpuesta con Cy5 para varios anticuerpos HER2 mono-específicos. Se representa para cada anticuerpo la intensidad de los píxeles de FITC en píxeles positivos de LAMP1/Cy5 de tres imágenes diferentes. El anticuerpo 005 muestra mayores intensidades de píxeles de FITC en los compartimentos positivos de LAMP1/Cy5 en comparación con los anticuerpos Herceptin y pertuzumab. Véase el Ejemplo 20 para obtener detalles.

Figura 10: Unión del anticuerpo HER2 a las células CHO-S transfectadas con diferentes construcciones del ECD de HER2 analizadas mediante citometría de flujo. Hu-HER2 = HER2 completamente humano, Hu-HER2-ch(I) CR1 = hu-HER2 con dominio I de pollo, Hu-HER2-ch(II) = hu-HER2 con dominio II de pollo, hu-HER2-ch(III) = hu-HER2 con dominio III de pollo y Hu-HER2-ch(IV) = hu-HER2 con dominio IV de pollo. Los datos mostrados son las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de un anticuerpo representativo, 106. Véase el Ejemplo 21 para obtener detalles.

Figura 11: Efecto *in vivo* del HuMab HER2 005 en el modelo de xenoinjerto de carcinoma gástrico humano NCI-N87 en ratones hembra CB.17 con inmunodeficiencia combinada grave (SCID, de sus siglas en inglés). Los datos mostrados son la media del tamaño del tumor \pm E.E.M. por grupo (n = 10 ratones por grupo) (A) y supervivencia (B). Véase el Ejemplo 22 para obtener detalles.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "HER2" (también conocido como ErbB-2, NEU, HER-2 y CD340), cuando se utiliza en el presente documento, se refiere al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (SwissProt P04626) e incluye cualquier variante, isoformas y homólogos de especies de HER2 que se expresan de forma natural mediante las células, incluidas las células tumorales, o se expresan en células transfectadas con el gen HER2. Las especies

homólogas incluyen HER2 de mono Rhesus (*Macaca mulatta*; n.º de registro GenBank GI:109114897).

El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glucoproteínas relacionadas estructuralmente que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro interconectadas mediante enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas ha sido bien caracterizada. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N. Y. (1989)). En resumen, cada cadena pesada está comprendida, normalmente, de una región variable de la cadena pesada (abreviado en el presente documento como V_H o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende, normalmente, tres dominios, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena ligera comprende, normalmente, una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende, normalmente, un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en secuencia y/o en forma de bucles estructuralmente definidos), también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada una de las V_H y V_L está compuesta, normalmente, por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). A menos que se establezca lo contrario o se contradiga con el contexto, las secuencias CDR en el presente documento se identifican de acuerdo con las reglas de IMGT (Brochet X., Nucl Acids Res. 2008;36:W503-508 and Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999;27:209-212; véase también la dirección http://www.imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanlg. Sin embargo, la numeración de restos de aminoácido en una secuencia de anticuerpo se puede realizar también mediante el método descrito en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (frases como "numeración de restos del dominio variable como en Kabat", "posición de Kabat" o "de acuerdo con Kabat" en el presente documento se refieren a este sistema de numeración). En particular, para la numeración de aminoácidos en la región constante, el sistema de numeración de índice de la UE de acuerdo con Kabat et al, citado anteriormente, se pueden utilizar. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

El término "anticuerpo" (Ab, de sus siglas en inglés) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina, o un derivado de cualquiera de ellos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas normales con una semivida de períodos de tiempo significativos, tal como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 o más días, etc., o cualquier otro período relevante definido funcionalmente (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, mejorar y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno y/o el tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora). Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con el antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, incluidas varias células del sistema inmunitario (tales como células efectoras) y componentes del sistema del complemento, tales como C1q, el primer componente en la vía clásica de la activación del complemento. El anticuerpo HER2 puede ser también un anticuerpo biespecífico, un diacuerpo o una molécula similar (véase, por ejemplo, PNAS utiliza 90(14), 6444-8 (1993) para una descripción de los diacuerpos). De hecho, los anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y similares, proporcionados por la presente invención pueden unirse a cualquier diana adecuada además de una porción de HER2. Como se indicó anteriormente, el término anticuerpo en el presente documento, a menos que se establezca lo contrario o se contradiga claramente con el contexto, incluye fragmentos de un anticuerpo que son fragmentos de unión a antígeno, es decir, retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluidos en el término "anticuerpo" incluyen (i) un fragmento Fab o Fab', un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}, o un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782 (Genmab); (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste, esencialmente, en los dominios V_H y C_{H1}; (iv) un fragmento Fv que consiste, esencialmente, en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341,544-546 (1989)), que consiste, esencialmente, en un dominio V_H y también llamados anticuerpos de dominio (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90); (vi) camélidos o nanocuerpos (Reverts et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24) y (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes independientes, estos se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite conformar una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos monocatenarios o Fv monocatenarios (scFv)), véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) y Huston et al., PNAS utiliza 85, 5879-5883 (1988)). Dichos anticuerpos monocatenarios están incluidos dentro del término anticuerpo, a menos que

se indique lo contrario o esté claramente indicado por el contexto. Aunque dichos fragmentos generalmente se incluyen dentro del significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno independientemente son características únicas de la presente invención, que exhiben diferentes propiedades biológicas y utilidad. Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles en el contexto de la presente invención, así como los formatos biespecíficos de dichos fragmentos, se discuten adicionalmente en el presente documento. También debe entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique otra cosa, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, y fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis de péptidos y técnicas recombinantes. Un anticuerpo como generado puede poseer cualquier isotipo.

Como se utiliza en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) que está codificada mediante los genes de la región constante de la cadena pesada.

La expresión "anticuerpo monovalente" significa en el contexto de la presente invención que una molécula de anticuerpo es capaz de unirse a una sola molécula del antígeno y, por lo tanto, no es capaz de reticular el antígeno.

Un "anticuerpo deficiente en la función efectora" o un "anticuerpo deficiente en función efectora" se refiere a un anticuerpo que tiene una capacidad significativamente reducida o nula para activar uno o más mecanismos efectores, tales como la activación del complemento o la unión al receptor Fc. Por tanto, los anticuerpos deficientes en función efectora tienen una capacidad significativamente reducida o nula para mediar en la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, de sus siglas en inglés). Un ejemplo de dicho anticuerpo es IgG4.

Un "anticuerpo HER2" o "anticuerpo anti-HER2" es un anticuerpo como se describe anteriormente, que se une específicamente al antígeno HER2.

La expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en que los que secuencias CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo humano "procede de" una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema que utiliza secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo, mediante la inmunización de un ratón transgénico portador de genes de inmunoglobulina humana o mediante la selección de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana, y donde el anticuerpo humano seleccionado es al menos el 90 %, tal como al menos el 95 %, por ejemplo, al menos el 96 %, tal como al menos el 97 %, por ejemplo, al menos el 98 %, o tal como al menos el 99 % idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Normalmente, fuera de la CDR3 de la cadena pesada, un anticuerpo humano procedente de una secuencia de línea germinal humana particular no mostrará más de 20 diferencias de aminoácidos, por ejemplo, no más de 10 diferencias de aminoácidos, tal como no más de 9, 8, 7, 6 o 5, por ejemplo, no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

El anticuerpo se puede aislar. Un "anticuerpo aislado", como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une de manera específica a HER2 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen de manera específica a antígenos que no sean HER2). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de HER2 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (tales como los homólogos de especies de HER2). Por otra parte, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos. En una realización de la presente invención, dos o más anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades de unión a antígeno se combinan en una composición bien definida.

Cuando se utiliza en el presente documento, en el contexto de dos o más anticuerpos, la expresión "compite con" o "compite de forma cruzada con" indica que los dos o más anticuerpos compiten por unirse a HER2, por ejemplo, compiten por la unión de HER2 en el ensayo descrito en el Ejemplo 14. Un anticuerpo "bloquea" o "bloquea de forma cruzada" uno o más anticuerpos que no se unen a HER2 si el anticuerpo compite con uno o más del 25 % de anticuerpos o más, con un 25 %-74 % representando un "bloqueo parcial" y un 75 %-100 % representando "bloqueo completo", preferentemente según lo determinado utilizando el ensayo del Ejemplo 14. Para algunos pares de anticuerpos, la competencia o el bloqueo en el ensayo de los Ejemplos solo se observa cuando un anticuerpo está

recubierto en la placa y el otro se utiliza para competir, y no al revés. A menos que se defina lo contrario o se niegue por contexto, las expresiones "compite con", "compite de forma cruzada con", "bloquea" o "bloquea de forma cruzada" cuando se utilizan en el presente documento también pretenden cubrir dichos pares de anticuerpos.

5 El término "epítopo" significa un determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítomos generalmente consisten en agrupaciones superficiales de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión a los primeros, pero no los últimos, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítopo puede comprender restos de aminoácidos directamente implicados en la unión (también llamado componente inmunodominante del epítopo) y otros restos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, como los restos de aminoácidos que están eficazmente bloqueados por el péptido de unión al antígeno específicamente (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión al antígeno específicamente).

15 La expresión "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente documento se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpos de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión únicas para un epítopo concreto. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que expresan una única especificidad de unión que tiene regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden generar mediante un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico o transcromosómico, tal como un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada y un transgén de la cadena ligera humanos, fusionados a una célula inmortalizada.

25 Como se utiliza en el presente documento, el término "unión" en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado es, normalmente, una unión con una afinidad correspondiente a una KD de aproximadamente 10-7 M o menos, tal como aproximadamente 10-8 M o menos, tal como aproximadamente 10-9 M o menos, aproximadamente 10-10 M o menos, o aproximadamente 10-11 M o incluso menos cuando se determina, por ejemplo, mediante tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR, de sus siglas en inglés) en un instrumento BIAcore 3000 que utiliza el antígeno como el ligando y el anticuerpo como el analito, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una KD que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo, al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo, al menos 100.000 veces menor que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) que no sea el antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la KD del anticuerpo, de modo que cuando la KD del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es muy específico), entonces la cantidad con la cual la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser al menos 10.000 veces.

40 El término " k_d " (seg^{-1}), como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. Dicho valor también se conoce como el valor k_{off} .

El término " k_a " ($\text{M}^{-1} \times \text{seg}^{-1}$), como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

45 El término " $K_D(\text{M})$ ", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

50 El término " $K_a(\text{M}^{-1})$ " como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno y se obtiene mediante la división de la k_a por la k_d .

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "inhibe la proliferación" (por ejemplo, refiriéndose a células, tales como células tumorales) pretende incluir cualquier disminución sustancial en la proliferación celular cuando se pone en contacto con un anticuerpo HER2 en comparación con la proliferación de las mismas células que no están en contacto con un anticuerpo HER2, por ejemplo, la inhibición de la proliferación de un cultivo celular en al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 % o al menos aproximadamente el 30 %, o al menos tanto como un anticuerpo de referencia como el trastuzumab, por ejemplo, como determinado mediante un ensayo en los Ejemplos.

60 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "promueve la proliferación" (por ejemplo, refiriéndose a células, tales como células tumorales) pretende incluir cualquier aumento sustancial en la proliferación celular cuando se pone en contacto con un anticuerpo HER2 en comparación con la proliferación de las mismas células que no están en contacto con un anticuerpo HER2, por ejemplo, la promoción de la proliferación de un cultivo celular en al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 % o al menos aproximadamente el 30 %, o al menos tanto como un anticuerpo de referencia como el F5, por ejemplo, como determinado mediante un ensayo en los Ejemplos.

Como se utiliza en el presente documento, "internalización", cuando se utiliza en el contexto de un anticuerpo HER2 incluye cualquier mecanismo mediante el cual el anticuerpo se internaliza en una célula que expresa HER2 de la superficie celular y/o del medio circundante, por ejemplo, a través de la endocitosis. La internalización de un anticuerpo se puede evaluar utilizando un ensayo directo que mide la cantidad de anticuerpo internalizado (tal como, por ejemplo, el ensayo fab-CypHer5E descrito en el Ejemplo 18), o un ensayo indirecto en donde se mide el efecto de un conjugado de toxina-anticuerpo internalizado (tal como, por ejemplo, el ensayo anti-kappa-ETA' del Ejemplo 17).

La presente divulgación también proporciona anticuerpos que comprenden variantes funcionales de la región VL, la región VH o una o más CDR de los anticuerpos de los ejemplos. Una variante funcional de una VL, VH o CDR utilizada en el contexto de un anticuerpo HER2 todavía permite que el anticuerpo retenga al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo parental y, en algunos casos, dicho anticuerpo HER2 puede estar asociado con una mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el anticuerpo parental.

Dichas variantes funcionales retienen, normalmente, una identidad de secuencia significativa con el anticuerpo parental. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que necesita introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede, por ejemplo, determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988) que se incorporó al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de restos de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970).

Las variantes ejemplares incluyen aquellas que difieren de una secuencia VH y/o VL del anticuerpo parental que se muestra en las Figuras 1 y 2 en una o más posiciones de aminoácidos "variantes", indicadas con "X" en la secuencia consenso correspondiente. Las variantes preferidas son aquellas en las que el nuevo aminoácido se selecciona de aquellos en la posición correspondiente en una de las secuencias alineadas en la Figura 1 o 2 (para detalles sobre las variantes de secuencia de CDR, véase la Tabla 4). De manera alternativa o adicional, la secuencia de variantes de VH, VL o CDR puede diferir de la secuencia de VH, VL o CDR de las secuencias de anticuerpos parentales principalmente por sustituciones conservativas; por ejemplo, al menos 10, tales como al menos 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 de las sustituciones en la variante son reemplazos conservativos de restos de aminoácidos.

En el contexto de la presente divulgación, las sustituciones conservativas pueden definirse mediante sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en la siguiente tabla:

Clases de restos de aminoácidos para sustituciones conservativas

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

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión, por ejemplo, un vector de expresión que codifica un anticuerpo de la invención. Las células hospedadoras recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células HEK293, células NS/0 y linfocitos.

La expresión "animal no humano transgénico" se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas de la cadena pesada y/o ligera humana (ya sea integrado o no integrado en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpos completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de la cadena ligera humana y un transgén de la cadena pesada humana o un transcromosoma de cadena pesada humana, de modo que el ratón produce anticuerpos HER2 humanos cuando se inmuniza con antígeno HER2 y/o células que expresan HER2. El transgén de la cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, los ratones HuMAb, como los ratones HCo7, HCo12 o HCo17, o el transgén de la cadena pesada humana se puede mantener de manera extracromosómica, como es el caso de los ratones KM transcromosómicos como se describe en el documento WO02/43478. Ratones similares, que tienen un repertorio de genes de Ab humano más grande, incluyen HCo7 y HCo20 (véase, por ejemplo, el documento WO2009097006). Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos (denominados colectivamente en el presente documento como "ratones transgénicos") son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra un

antígeno dado (tal como IgG, IgA, IgM, IgD y/o IgE) al someterse a recombinación V-D-J y a cambio de isotipo. El animal no humano transgénico también se puede utilizar para la producción de anticuerpos contra un antígeno específico mediante la introducción de genes que codifican dicho anticuerpo específico, por ejemplo, mediante la unión de manera operativa de los genes a un gen que se expresa en la leche del animal.

5 "Tratamiento" se refiere a la administración de una cantidad eficaz de un compuesto terapéuticamente activo de la presente invención con el propósito de aliviar, mejorar, detener o erradicar (curar) los síntomas o estados de enfermedad.

10 Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo HER2 puede variar de acuerdo con factores, tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y de la capacidad del anticuerpo HER2 para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una
15 cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Un anticuerpo "antiidiotipo" es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo.

20 Como se ha descrito anteriormente, en un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une a HER2.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden producirse, por ejemplo, mediante el método de
25 hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), o pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar a partir de fagotecas de anticuerpos utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991). Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse de cualquier fuente adecuada. Por tanto, por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas preparados a partir de
30 linfocitos B esplénicos murinos obtenidos de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse a partir de hibridomas procedentes de células que expresan anticuerpos de seres humanos inmunizados o de mamíferos no humanos, como ratas, perros, primates, etc.

El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos
35 contra HER2 humana se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcrómicos que contienen partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Dichos ratones transgénicos y transcrómicos incluyen ratones denominados en el presente documento como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan conjuntamente en el presente documento "ratones trasgénicos".

40 El ratón HuMAb contiene miniloci del gen de la inmunoglobulina humana que codifica las secuencias de la inmunoglobulina de la cadena pesada (μ y γ) y la cadena ligera κ humana no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de las cadenas μ y κ (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856-859 (1994)). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de IgM o κ de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humanos introducidos, sufren un cambio de clase y mutación somática
45 para generar anticuerpos monoclonales anti-IgG, κ humana de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), citado anteriormente; revisado en Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65-93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 764 536-546 (1995)). La preparación de los ratones HuMAb se describe en detalle en Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647-656 (1993), Tuailon et al., *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Véase también los documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

55 Los ratones HCo7, HCo12, HCo17 y HCo20 tienen una alteración de JKD en sus genes endógenos de la cadena ligera (κ) (como se describe en Chen et al., *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), una alteración de CMD en sus genes endógenos de la cadena pesada (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424) y un transgen de la cadena ligera κ humana KCo5 (como se describe en Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)). De manera adicional, los ratones HCo7 tienen un transgén de la cadena pesada humana HCo7 (como se describe en el documento US 5.770.429), los ratones HCo12 tienen un transgén de la cadena pesada humana
60 HCo12 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/14424), los ratones HCo17 tienen un transgen de la cadena pesada humana HCo17 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/09187) y los ratones HCo20 tienen un transgen de la cadena pesada humana HCo20. Los ratones resultantes expresan transgenes de las cadenas ligera κ y pesada de inmunoglobulina humana en un fondo homocigótico para la alteración de los
65 loci de las cadenas ligera κ y pesada endógenas de ratón.

En la cepa de ratón KM, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón se ha alterado de forma homocigota como se describe en Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993) y el gen endógeno de la cadena pesada de ratón se ha alterado de forma homocigota como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón lleva un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también lleva un transcromosoma humano de la cadena pesada compuesto del fragmento de cromosoma 14 hCF (SC20) como se describe en el documento WO 02/43478. Los ratones HCo12-Balb/C se pueden generar mediante el cruzamiento de HCo12 a KCo5[J/K](Balb) como se describe en el documento WO 097006. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos se pueden utilizar para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas.

Además, los anticuerpos humanos de la presente invención o los anticuerpos de la presente invención de otras especies pueden identificarse a través de tecnologías de tipo de visualización, incluyendo, sin limitación, presentación en fagos, presentación retroviral, presentación ribosomal y otras técnicas, que utilizan técnicas bien conocidas en la materia y las moléculas resultantes pueden someterse a una maduración adicional, tal como maduración de afinidad, siendo dichas técnicas bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (presentación en fagos), Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996) (presentación en fagos), Hanes and Plutchau, PNAS utiliza 94, 4937-4942 (1997) (presentación ribosomal), Parmley y Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (presentación en fagos), Scott TIBS 17, 241-245 (1992), Cwirla et al., PNAS utiliza 87, 6378-6382 (1990), Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992), Chiswell y McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992), y el documento US 5.733.743). Si se utilizan tecnologías de visualización para producir anticuerpos que no son humanos, dichos anticuerpos pueden humanizarse.

En un aspecto, el anticuerpo HER2 de la invención se une al dominio III de HER2 humano. Los inventores de la presente invención han demostrado que los anticuerpos 005, 006, 059, 060, 106 y 111 muestran una internalización mejorada, una degradación lisosomal y una toxicidad en el sistema modelo anti-kappa-ETA'. Por lo tanto, sin estar vinculado por ninguna teoría, la unión de un anticuerpo al dominio III de HER2 puede ser importante para la internalización del anticuerpo y, por lo tanto, útil para los conjugados de fármacos y anticuerpos (ADC). Los anticuerpos 005, 006, 059, 060, 106 y 111 reconocen un epítipo que reside en el dominio III de HER2, que no tiene función conocida en la heterodimerización de HER2. Mientras, se ha informado que el dominio IV de HER2 (unido mediante Herceptin) está involucrado en la heterodimerización independiente de ligando de HER2 (Juntilla et al., Cancer Cell 2009; 15:429-440), y se ha informado de que el dominio II de HER2 (unido mediante pertuzumab) está involucrado en la heterodimerización de HER2 inducida por ligandos (Landgraf et al., Breast Cancer Research 2007; 9: 202). La hipótesis es que la formación de heterodímeros HER2/ErbB es fundamental para obtener una internalización y degradación suficientes de los complejos de receptor/anticuerpo HER2. Por lo tanto, los anticuerpos HER2 que utilizan la internalización y degradación impulsada por el heterodímero HER2 parecen muy atractivos para las futuras terapias de ADC dirigidas a HER2. En particular, en células tumorales que no sobreexpresan HER2 a niveles extremadamente altos, la formación de heterodímeros HER2/ErbB puede representar un enfoque atractivo para los anticuerpos HER2 para administrar un ADC.

El anticuerpo HER2 de la presente divulgación, puede ser un anticuerpo que no bloquea la unión a HER2 soluble de un segundo anticuerpo, opcionalmente en forma inmovilizada, que comprende las secuencias VH y VL de cualquiera de trastuzumab, pertuzumab, F1 y C5, cuando se determinan como se describe en el Ejemplo 14.

El anticuerpo puede bloquear o bloquear de forma cruzada la unión a HER2 soluble de uno o más de los nuevos anticuerpos humanos descritos en el presente documento.

El anticuerpo puede bloquear la unión a HER2 soluble de un anticuerpo de referencia, opcionalmente inmovilizado, en donde el anticuerpo de referencia comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**), preferentemente en donde el anticuerpo está completamente bloqueado cuando se determina como se describe en el Ejemplo 14.

El anticuerpo puede bloquear la unión a HER2 soluble de un anticuerpo de referencia, opcionalmente inmovilizado, en donde el anticuerpo de referencia comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12 (**006**), preferentemente en donde el anticuerpo está completamente bloqueado cuando se determina como se describe en el Ejemplo 14.

El anticuerpo puede bloquear la unión a HER2 soluble de un anticuerpo de referencia, opcionalmente inmovilizado, en donde el anticuerpo de referencia comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (**059**), preferentemente en donde el anticuerpo está completamente bloqueado cuando se determina como se describe en el Ejemplo 14.

El anticuerpo puede bloquear la unión a HER2 soluble de un anticuerpo de referencia, opcionalmente inmovilizado, en donde el anticuerpo de referencia comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (**060**), preferentemente en donde el anticuerpo está completamente bloqueado cuando se determina como se describe en el Ejemplo 14.

El anticuerpo puede bloquear la unión a HER2 soluble de un anticuerpo de referencia, opcionalmente inmovilizado, en donde el anticuerpo de referencia comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 (**106**), preferentemente en donde el anticuerpo está completamente bloqueado cuando se determina como se describe en el Ejemplo 14.

5 El anticuerpo puede bloquear la unión a HER2 soluble de un anticuerpo de referencia, opcionalmente inmovilizado, en donde el anticuerpo de referencia comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 (**111**), preferentemente en donde el anticuerpo está completamente bloqueado cuando se determina como se describe en el Ejemplo 14.

10 El anticuerpo tal como se desvela en el presente documento puede bloquear la unión de dos, tres, cuatro, cinco o seis anticuerpos de referencia de la realización anterior, tales como, por ejemplo, los anticuerpos 005 y 111, los anticuerpos 005 y 006; los anticuerpos 059 y 106; los anticuerpos 006 y 059; los anticuerpos 059, 106, 005 y 060; los anticuerpos 006, 59, 060 y 111; o los anticuerpos 059, 106, 005, 060, 111 y 006.

15 El anticuerpo puede competir por al menos el 25 %, preferentemente al menos el 50 % para unirse a HER2 soluble con todo lo siguiente:

- 20 un anticuerpo de referencia, opcionalmente inmovilizado, que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**);
- un anticuerpo de referencia, opcionalmente inmovilizado, que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (**059**);
- un anticuerpo de referencia, opcionalmente inmovilizado, que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (**060**);
- 25 un anticuerpo de referencia, opcionalmente inmovilizado, que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 (**106**);
- un anticuerpo de referencia, opcionalmente inmovilizado, que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 (**111**), cuando se determinan como se describe en el Ejemplo 14.

30 Cuando está inmovilizado, el anticuerpo puede bloquear la unión a HER2 soluble de al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

- 35 un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**);
- un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12 (**006**);
- un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (**059**);
- 40 un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (**060**);
- un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 (**106**); y
- 45 un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 (**111**), preferentemente en donde el anticuerpo inmovilizado está totalmente bloqueado cuando se determina como se describe en el Ejemplo 14.

50 Cuando está inmovilizado, el anticuerpo puede competir por la unión a HER2 soluble con todos los anticuerpos definidos en la realización anterior por el 25 % o más, preferentemente, el 50 % o más, cuando se determinan como se describe en el Ejemplo 14.

El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo en HER2 que uno o más de los nuevos anticuerpos humanos descritos en el presente documento.

55 El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**).

60 El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12 (**006**).

El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (**059**).

65 El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (**060**).

El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 (**106**).

5 El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 (**111**).

El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

- 10 a) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 43 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 44 (**041**)
 b) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 45 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 46 (**150**), y
 c) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 47 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 48 (**067**);
 15 d) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 50 (**072**);
 e) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 51 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 52 (**163**);
 20 f) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 53 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 54 (**093**);
 g) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 55 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56 (**044**).

25 La presente divulgación proporciona además un anticuerpo que se une a HER2 y comprende una secuencia de la CDR3 VH, de la región VH y/o de la región VL similar o idéntica a una secuencia de los nuevos anticuerpos descritos en el presente documento.

30 En una realización, el anticuerpo comprende una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 2, 3 y 4, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 6, GAS, y SEQ ID NO: 7, respectivamente (**005**).

35 En una realización, el anticuerpo comprende una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 9, 10 y 11, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 13, DAS, y SEQ ID NO: 14, respectivamente (**006**).

En una realización, el anticuerpo comprende una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 20, GAS, y SEQ ID NO: 21, respectivamente (**059**).

40 En una realización, el anticuerpo comprende una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 27, GAS, y SEQ ID NO: 28, respectivamente (**060**).

45 En una realización, el anticuerpo comprende una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 30, 31 y 32, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 34, GAS, y SEQ ID NO: 35, respectivamente (**106**).

50 En una realización, el anticuerpo comprende una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 41, GAS, y SEQ ID NO: 42, respectivamente (**111**).

El anticuerpo puede comprender:

- 55 a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**)
 b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 (**006**)
 c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (**059**)
 60 d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (**060**)
 e) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 (**106**)
 65 f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 (**111**)
 g) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 43 y, preferentemente, una región VL que

comprende la secuencia de SEQ ID NO: 44 (**041**)

h) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 45 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 46 (**150**),

5 i) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 47 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 48 (**067**),

j) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 50 (**072**),

k) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 51 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 52 (**163**),

10 l) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 53 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 54 (**093**),

m) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 55 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56 (**044**),

15 En realizaciones separadas, el anticuerpo comprende:

a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**)

20 b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 (**006**)

c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (**059**)

d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (**060**)

25 e) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 (**106**)

f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 (**111**)

30 g) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 43 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 44 (**041**)

h) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 45 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 46 (**150**),

i) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 47 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 48 (**067**),

35 j) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 50 (**072**),

k) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 51 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 52 (**163**),

40 l) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 53 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 54 (**093**), y

m) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 55 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56 (**044**).

45 El anticuerpo puede bloquear de forma cruzada parcial o completamente la unión a HER2 soluble de uno o más de los nuevos anticuerpos descritos en el presente documento, preferentemente cuando se determinan como se describe en el Ejemplo 14; y puede caracterizarse adicionalmente por una o más propiedades determinadas como se describe en los Ejemplos 12, 13, 15, 16, 17 y 18.

50 En una realización, el anticuerpo HER2 tiene un valor de EC_{50} inferior, que es inferior a 0,80, 0,50 o 0,30 $\mu\text{g/ml}$, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 12, y bloquea la unión a HER2 soluble de un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en

a) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**);

55 b) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 (**006**); y

c) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (**059**).

60 El anticuerpo de la realización precedente se une preferentemente al mismo epítipo que el anticuerpo 005, 006, 059, o una combinación de los mismos.

65 En una realización adicional o alternativa, el anticuerpo HER se une específicamente a células epiteliales de Rhesus positivas para HER2, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 13, y bloquea la unión a HER2 soluble de un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**)
- b) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 (**006**)
- 5 c) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (**059**)
- d) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (**060**)
- 10 e) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 (**106**)
- f) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 (**111**).

El anticuerpo de la realización precedente se une preferentemente al mismo epítipo que el anticuerpo 005, 006, 15 059, 060, 106, 111 o una combinación de los mismos.

El anticuerpo HER2 puede unirse específicamente a las células AU565 que expresan HER2 pero promover la proliferación independiente de ligando de las células menos de F5, preferentemente, promoviendo la proliferación en 20 menos del 30 %, más preferentemente, en menos del 20 %, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 16, y bloquear de forma cruzada al menos un anticuerpo seleccionado de:

- a) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**); y
- 25 b) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (**060**).

El anticuerpo de la realización precedente se une preferentemente al mismo epítipo que el anticuerpo 005, 060, o una combinación de los mismos.

30 En una realización adicional o alternativa, el anticuerpo, cuando se conjuga directa o indirectamente con una fracción terapéutica, tal como una forma troncada de la pseudomonas-exotoxina A, es más eficaz que el trastuzumab para destruir células AU565, células A431 o ambas células AU565 y A431, cuando se determinan como se describe en el Ejemplo 17.

35 En una realización, el anticuerpo conjugado destruye al menos el 60 %, preferentemente al menos el 70 % de una línea celular tumoral que expresa HER2, tal como las células AU565 o las células A431, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 17, y bloquea la unión a HER2 soluble de una referencia seleccionada de

- a) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**)
- 40 b) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (**060**)
- c) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (**059**), y
- 45 d) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 (**111**).

El anticuerpo de la realización precedente se une, preferentemente, al mismo epítipo que el anticuerpo 005, 060, 50 059, 111, o una combinación de los mismos.

Cuando se conjuga directa o indirectamente con una fracción terapéutica, el anticuerpo puede ser capaz de destruir células tumorales que expresan una cantidad promedio más baja de copias de HER2 por célula que las células AU565, como un promedio de aproximadamente 500.000 o menos, 100.000 o menos, o 30.000 o menos copias de HER2 por célula (cuando se determina, por ejemplo, como se menciona en el Ejemplo 12), en concentraciones 55 donde el anticuerpo no conjugado no induce la destrucción de las células, preferentemente cuando se determina como se describe en el Ejemplo 17.

El anticuerpo de la realización anterior puede destruir al menos el 80 % de las células A431 cuando se determina como se describe en el Ejemplo 17, y bloquear de forma cruzada al menos un anticuerpo seleccionado de

- a) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**), y
- 60 b) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (**060**).

65 El anticuerpo de la realización precedente se une preferentemente al mismo epítipo que el anticuerpo 005, 060 o

una combinación de los mismos.

En una realización adicional o alternativa, el anticuerpo es internalizado por células tumorales que expresan HER2, como las células AU565, en una cantidad mayor que el trastuzumab, preferentemente, más de dos veces o tres veces la cantidad de trastuzumab internalizado, cuando se determina de acuerdo con el Ejemplo 18, y bloquea de forma cruzada al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**)
- b) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 (**006**)
- c) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (**059**)
- d) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (**060**)
- e) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 (**106**)
- f) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 (**111**).

El anticuerpo de la realización precedente se une preferentemente al mismo epítipo que el anticuerpo 005, 006, 059, 060, 106, 111 o una combinación de los mismos.

El anticuerpo puede promover la proliferación de células tumorales que expresan HER2 menos que F5, y se internaliza más que el trastuzumab en células tumorales que expresan HER2, preferentemente cuando se determina como se describe en los Ejemplos.

Formatos de anticuerpos

La presente invención proporciona anticuerpos HER2 que se unen a e internalizan de manera eficaz en células tumorales que expresan HER2, normalmente sin promover significativamente la proliferación de las células independiente del ligando. Dependiendo de las propiedades funcionales deseadas para un uso particular, los anticuerpos particulares se pueden seleccionar del conjunto de anticuerpos proporcionado en la presente invención y/o su formato se puede adaptar para cambiar estas propiedades, como se describe más adelante.

El anticuerpo de la invención puede ser de cualquier isotipo. La elección del isotipo, normalmente, se guiará por las funciones efectoras deseadas, tales como la inducción ADCC. Los isotipos ejemplares son IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Se puede utilizar cualquiera de las regiones constantes de la cadena ligera humana, kappa o lambda. Si se desea, la clase de un anticuerpo HER2 de la presente invención puede cambiarse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención que originalmente era IgM se puede cambiar de clase a un anticuerpo IgG de la presente invención. Además, se pueden utilizar técnicas de cambio de clase para convertir una subclase de IgG a otra, por ejemplo de IgG1 a IgG2. Por tanto, la función efectora de los anticuerpos de la presente invención puede cambiarse mediante el cambio de isotipo a, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM para diversos usos terapéuticos. En una realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo IgG1, por ejemplo, un IgG1,κ.

El anticuerpo de la invención puede ser modificado por ingeniería genética para reducir la fucosa y así aumentar la ADCC, por ejemplo, mediante la adición de compuestos a los medios de cultivo durante la producción de anticuerpos como se describe en el documento US2009317869 o como se describe en van Berkel et al. (2010) Biotechnol. Bioeng. 105:350 o mediante el uso de células FUT8 desactivadas, por ejemplo, como se describe en Yamane-Ohnuki et al (2004) Biotechnol. Bioeng 87:614. La ADCC puede optimizarse alternativamente utilizando el método descrito por Umaña et al. (1999) Nature Biotech 17:176.

El anticuerpo de la invención puede diseñarse para potenciar la activación del complemento, por ejemplo, como se describe en Natsume et al. (2009) Cancer Sci. 100:2411.

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de longitud completa, preferentemente, un anticuerpo IgG1, en particular, un anticuerpo IgG1,κ. Como alternativa, el anticuerpo de la invención puede ser un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario.

Los fragmentos de anticuerpos pueden, por ejemplo, obtenerse mediante fragmentación utilizando técnicas convencionales, y los fragmentos se seleccionarán para determinar su utilidad de la misma manera que se describe en el presente documento para anticuerpos completos. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ se pueden generar tratando un anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro con un agente reductor, tal como el ditiotreitól, para producir fragmentos Fab'. Los fragmentos Fab se pueden obtener tratando un anticuerpo con papaína. También se puede producir un fragmento F(ab')₂ mediante la unión de

los fragmentos de Fab' a través de un enlace tioéter o un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpos también se pueden generar mediante la expresión de ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos en células recombinantes (véase, por ejemplo, Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)). Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una parte de un fragmento F(ab')₂ podría incluir secuencias de ADN que codifican el dominio C_H1 y la región bisagra de la cadena H, seguido de un codón de terminación de la traducción para producir dicha molécula de fragmento de anticuerpo truncado.

Tal y como se ha explicado anteriormente, en una realización, el anticuerpo HER2 de la invención es un anticuerpo bivalente.

En otra realización, el anticuerpo HER2 de la invención es un anticuerpo monovalente.

El anticuerpo de la invención puede ser un fragmento Fab o un anticuerpo monocatenario, tal como se describe en el documento US20080063641 (Genentech) u otro anticuerpo monovalente, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO2007048037(Amgen).

En una realización preferida, un anticuerpo monovalente tiene una estructura como se describe en el documento WO2007059782 (Genmab) que tiene una delección de la región bisagra. Por consiguiente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monovalente, en donde dicho anticuerpo HER2 puede construirse mediante un método que comprende:

- i) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo HER2 específico del antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica la región CL constante de una Ig, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo específico del antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CL de una Ig están unidas operativamente, y en donde, en el caso de un subtipo IgG1, la secuencia de nucleótidos que codifica la región CL se ha modificado de tal manera que la región CL no contiene ningún aminoácido capaz de formar enlaces disulfuro o enlaces covalentes con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CL en presencia de IgG policlonal humana o cuando se administra a un animal o ser humano;
- ii) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico del antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica una región CH constante de una Ig humana, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la región CH se ha modificado de tal manera que la región correspondiente a la región bisagra y, según lo requerido por el subtipo Ig, otras regiones de la región CH, como la región CH3, no comprende ningún resto de aminoácido que participe en la formación de enlaces disulfuro o enlaces de cadenas inter-pesadas no covalentes covalentes o estables con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CH de la Ig humana en presencia de IgG policlonal humana o cuando se administran a un animal humano, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico del antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CH de dicha Ig están operativamente unidos;
- iii) proporcionar un sistema de expresión celular para producir dicho anticuerpo monovalente;
- iv) producir dicho anticuerpo monovalente mediante la expresión conjunta de las construcciones de ácido nucleico de (i) y (ii) en células del sistema de expresión celular de (iii).

De manera similar, en una realización, el anticuerpo HER2 es un anticuerpo monovalente, que comprende

- (i) una región variable de un anticuerpo de la invención como se describe en el presente documento o una parte de unión a antígeno de dicha región, y
- (ii) una región C_H de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma que comprende las regiones C_H2 y C_H3, en donde la región C_H o fragmento de la misma se ha modificado de tal manera que la región correspondiente a la región bisagra y, si la inmunoglobulina no es un subtipo IgG4, otras regiones de la región C_H, como la región C_H3, no comprenden ningún resto de aminoácido, que sea capaz de formar enlaces disulfuro con una región C_H idéntica u otros enlaces de cadena inter-pesada no covalente covalentes o estables con una región C_H idéntica en presencia de IgG policlonal humana.

En una realización adicional del presente documento, la cadena pesada del anticuerpo HER2 monovalente se ha modificado de tal manera que se ha eliminado toda la bisagra.

El anticuerpo monovalente puede ser del subtipo IgG4, pero la región C_H3 se ha modificado de modo que se hayan realizado una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos:

Numeración de mutaciones de CH3

KABAT*	Índice G4* de la UE	Mutaciones
E378	E357	E357A o E357T o E357V o E357I
S387	S364	S364R o S364K
T389	T366	T366A o T366R o T366K o T366N
L391	L368	L368A o L368V o L368E o L368G o L368S o L368T
D427	D399	D399A o D399T o D399S
F436	F405	F405A o F405L o F405T o F405D o F405R o F405Q o F405K o F405Y
Y438	Y407	Y407A o Y407E o Y407Q o Y407K o Y407F
F436 y Y438	F405 y Y407	(F405T y Y407E) o (F405D y Y407E)
D427 y Y438	D399 y Y407	(D399S y Y407Q) o (D399S y Y407K) o (D399S y Y407E)

*KABAT indica la numeración de aminoácidos de acuerdo con Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). El índice de la UE indica la numeración de aminoácidos de acuerdo con el índice de la UE como se describe en Kabat et al., (anteriormente citado).

La secuencia de dicho anticuerpo monovalente también puede haber sido modificada para que no comprenda ningún sitio aceptor para la glucosilación unida a N.

5

Los anticuerpos HER2 de la invención también incluyen anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios son péptidos en los que las regiones Fv de la cadena pesada y ligera están conectadas. En una realización, la presente invención proporciona una Fv monocatenaria (scFv) en donde las cadenas pesada y ligera en la Fv de un anticuerpo HER2 de la presente invención se unen con un enlazador peptídico flexible (normalmente de aproximadamente 10, 12, 15 o más restos de aminoácidos) en una sola cadena peptídica. Los métodos para producir dichos anticuerpos se describen en, por ejemplo, el documento US 4.946.778, Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994), Bird et al., Science 242, 423-426 (1988), Huston et al., PNAS utiliza 85, 5879-5883 (1988) y McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990). El anticuerpo monocatenario puede ser monovalente, si solo se utiliza una sola V_H y V_L, bivalente, si se utilizan dos V_H y V_L, o polivalente, si se utilizan más de dos V_H y V_L.

10

15

En una realización, el anticuerpo HER2 de la invención es un anticuerpo deficiente en la función efectora. El anticuerpo HER2 deficiente en la función efectora puede ser un anticuerpo IgG4 estabilizado, que se ha modificado para prevenir el intercambio del brazo Fab (van der Neut Kolfshoten et al. (2007) Science 317 (5844): 1554-7). Ejemplos de anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados son anticuerpos, en donde la arginina en la posición 409 en una región constante de la cadena pesada de la IgG4 humana, que se indica en el índice de la UE como en Kabat et al., está sustituida por lisina, treonina, metionina o leucina, preferentemente lisina (descrita en el documento WO2006033386 (Kirin)) y/o en donde la región bisagra se ha modificado para comprender una secuencia Cys-Pro-Cys.

20

25

El anticuerpo HER2 IgG4 estabilizado puede ser un anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena pesada comprende una región constante de IgG4 humana que tiene un resto seleccionado del grupo que consiste en: Lys, Ala, Thr, Met y Leu en la posición correspondiente a 409 y/o un resto seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Val, Gly, Ile y Leu en la posición correspondiente a 405, y en donde dicho anticuerpo comprende opcionalmente una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones adicionales, pero no comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra. Preferentemente, dicho anticuerpo comprende un resto de Lys o Ala en la posición correspondiente a 409 o la región CH3 del anticuerpo ha sido reemplazada por la región CH3 de IgG1 humana, de IgG2 humana o de IgG3 humana. Véase también el documento WO2008145142 (Genmab).

30

35

El anticuerpo HER2 IgG4 estabilizado puede ser un anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena pesada comprende una región constante de IgG4 humana que tiene un resto seleccionado del grupo que consiste en: Lys, Ala, Thr, Met y Leu en la posición correspondiente a 409 y/o un resto seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Val, Gly, Ile y Leu en la posición correspondiente a 405, y en donde dicho anticuerpo comprende opcionalmente una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones adicionales y donde dicho anticuerpo comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra. Preferentemente, dicho anticuerpo comprende un resto de Lys o Ala en la posición correspondiente a 409 o la región CH3 del anticuerpo ha sido reemplazada por la región CH3 de IgG1 humana, de IgG2 humana o de IgG3 humana.

40

45

El anticuerpo HER2 deficiente en la función efectora es un anticuerpo de tipo no IgG4, por ejemplo IgG1, IgG2 o IgG3 que se ha mutado de tal manera que la capacidad de mediar funciones efectoras, tal como ADCC, se ha reducido o incluso eliminado. Dichas mutaciones, por ejemplo, se han descrito en Dall'Acqua WF et al., J Immunol. 177(2): 1129-1138 (2006) y Hezareh M, J Virol. ;75(24):12161-12168 (2001).

Conjugados

En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo HER2 conjugado con una fracción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco, tal como un fármaco quimioterapéutico, una citocina o un radioisótopo. Asimismo, el anticuerpo HER2 puede conjugarse con un inmunosupresor. Dichos conjugados se denominan en el presente documento como "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas se conocen como "inmunotoxinas".

Una citotoxina o agente citotóxico puede incluir cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, las destruye). Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunconjugados de la presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiانترacindiona, maitansina o un análogo o derivado de la misma, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina.; caliqueamicina o análogos o derivados de la misma; antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina, hidroxiurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados del platino, tales como carboplatino; así como duocarmicina A, duocarmicina SA, CC-1065 (alias raquelmicina), o análogos o derivados de CC-1065), antibióticos (tales como dactinomicina (formalmente actinomicina), bleomicina, daunorubicina (formalmente daunomicina), doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramycin (AMC)), agentes antimitóticos (por ejemplo, inhibidores de tubulina) tales como monometil auristatina E, monometil auristatina F, u otros análogos o derivados de dolastatina 10; toxina de la difteria y moléculas relacionadas (tales como la cadena A de la difteria y fragmentos activos de la misma y moléculas híbridas); toxina de ricina (como la ricina A o una toxina de cadena A de ricina desglucosilada), toxina colérica, una toxina tipo Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina tetánica, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modicina, gelatina, la cadena A de abrina, la cadena A de modicina, alfasarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, el inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y toxinas de enomicina. Otras moléculas conjugadas adecuadas incluyen péptidos antimicrobianos/lífticos tales como CLIP, Magainina 2, melitina, Cecropina, y P18; ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antiviral de la hierba carmín, toxina diftérica y endotoxina de *Pseudomonas*. Véase, por ejemplo, Pastan et al., Cell 47, 641 (1986) y Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994). Los agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con un anticuerpo HER2 de la presente invención como se describe en otra parte del presente documento, tales como, por ejemplo, citocinas o quimioterapias anticancerígenas, también son candidatos para fracciones terapéuticas útiles para la conjugación con un anticuerpo de la presente invención.

El anticuerpo HER2 puede comprender un ácido nucleico conjugado o una molécula asociada a ácido nucleico. El ácido nucleico conjugado puede ser una ribonucleasa citotóxica, un ácido nucleico antisentido, una molécula de ARN inhibidora (por ejemplo, una molécula de ARNip) o un ácido nucleico inmunestimulador (por ejemplo, una molécula de ADN inmunestimuladora que contiene un motivo CpG). En otra realización, un anticuerpo HER2 de la invención se conjuga con un aptámero o una ribozima.

Se proporcionan de acuerdo con la presente divulgación anticuerpos HER2 que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Un anticuerpo HER2 radiomarcado se puede utilizar tanto para fines diagnósticos como terapéuticos (otra conjugación con moléculas radiomarcadas es otra característica posible). Los ejemplos no limitantes de marcadores para polipéptidos incluyen ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹²⁵I, ¹¹¹In, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ²¹³Bs, ²²⁵Ac y ²²⁷Th.

El anticuerpo puede conjugarse con un radioisótopo o con un quelato que contiene radioisótopos. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con un enlazador quelante, por ejemplo, DOTA, DTPA o tiuxetan, que permite la complejación del anticuerpo con un radioisótopo. El anticuerpo también puede, o comprender alternativamente, o conjugarse con uno o más aminoácidos radiomarcados u otra molécula radiomarcada. Se puede utilizar un anticuerpo CD74 radiomarcado con fines tanto diagnósticos como terapéuticos. Ejemplos no limitantes de radioisótopos incluyen ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹²⁵I, ¹¹¹In, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ²¹³Bs, ²²⁵Ac y ²²⁷Th.

Los anticuerpos HER2 también pueden modificarse químicamente mediante conjugación covalente a un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida circulante. Los polímeros ejemplares y los métodos para unirlos a péptidos, se ilustran en, por ejemplo, los documentos US 4.766.106, US 4.179.337, US 4.495.285 y US 4.609.546. Los polímeros adicionales incluyen polioles polioxiethylados y polietilenglicol (PEG) (por ejemplo, un PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 40.000, tal como entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 20.000).

Cualquier método conocido en la materia para conjugar el anticuerpo HER2 con la(s) molécula(s) conjugada(s), tales como los descritos anteriormente, se puede emplear, incluyendo el método descrito por Hunter et al., Nature 144, 945 (1962), David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974), Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981) y Nygren, J.

Histochem. y Cytochem. 30, 407 (1982). Dichos anticuerpos pueden producirse mediante la conjugación química de la otra fracción con el lado N-terminal o el lado C-terminal del anticuerpo HER2 o fragmento del mismo (por ejemplo, una cadena H o L del anticuerpo HER2) (véase, por ejemplo, Antibody Engineering Handbook, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)). Dichos derivados de anticuerpos conjugados también se pueden generar mediante conjugación en restos internos o azúcares, cuando sea apropiado.

Los agentes pueden acoplarse directa o indirectamente a un anticuerpo HER2 de la presente invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto de un segundo agente es el acoplamiento a través de una fracción espaciadora a restos de cisteína o lisina en el anticuerpo. En una realización, un anticuerpo HER2 se conjuga con una molécula profármaco que se puede activar *in vivo* con un fármaco terapéutico a través de un espaciador o enlazador. Después de la administración, los espaciadores o enlazadores se escinden mediante enzimas asociadas a células tumorales u otras afecciones específicas del tumor, mediante las cuales se forma el fármaco activo. Ejemplos de dichas tecnologías de profármacos y enlazadores se describen en los documentos WO02083180, WO2004043493, WO2007018431, WO2007089149, y WO2009017394 por Syntarga BV, et al. La tecnología de profármaco-anticuerpo adecuada y los análogos de duocarmicina también se pueden encontrar en la Patente de Estados Unidos N.º 6.989.452 (Medarex).

El anticuerpo HER2 de la presente invención puede unirse a un enlazador quelante, por ejemplo, tiuxetan, que permite conjugar el anticuerpo a un radioisótopo.

Anticuerpos biespecíficos

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula biespecífica que comprende un primer sitio de unión a antígeno de un anticuerpo HER2 de la invención como se describió en el presente documento anteriormente y un segundo sitio de unión a antígeno con una especificidad de unión diferente, tal como una especificidad de unión para una célula efectora humana, un receptor Fc humano, un receptor de linfocitos T, un receptor de linfocitos B o una especificidad de unión para un epítipo no superpuesto de HER2, es decir, un anticuerpo biespecífico en donde el primer y segundo sitios de unión a antígeno no se bloquean entre sí para la unión a HER2, por ejemplo, cuando se prueba como se describe en el Ejemplo 14.

Las moléculas ejemplares de anticuerpos biespecíficos de la invención comprenden (i) dos anticuerpos, uno con una especificidad por HER2 y otro por una segunda diana que se conjugan entre sí, (ii) un único anticuerpo que tiene una cadena o brazo específico de HER2 y una segunda cadena o brazo específico para una segunda molécula, (iii) un anticuerpo monocatenario que tiene especificidad para HER2 y una segunda molécula, por ejemplo, a través de dos scFv unidas en tándem por un conector peptídico adicional; (iv) un anticuerpo de dominio variable doble (DVD-Ig), donde cada cadena ligera y pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, en: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (v) un fragmento (Fab')₂ biespecífico químicamente unido; (vi) un TandAb, que es una fusión de dos diacuerpos monocatenarios que dan como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana; (vii) un flexocuerpo, que es una combinación de scFv con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (viii) una denominada molécula "dock and lock", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" en la Proteína cinasa A, que, cuando se aplica a Fab, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (ix) una denominada molécula Escorpión, que comprende, por ejemplo, dos scFv fusionadas a ambos extremos de una región Fc humana; y (x) un diacuerpo. En una realización, el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un diacuerpo.

La segunda molécula puede ser un antígeno de cáncer/antígeno asociado a tumor, como el antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de próstata (AEP), RAGE (antígeno renal), α -fetoproteína, CAMEL (antígeno reconocido en CTL en el melanoma), antígenos CT (tales como MAGE-B5, -B6, -C2, -C3, y D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE, y SAGE), antígenos de mucina (por ejemplo, MUC1, mucina-CA125, etc.), antígenos gangliósidos, tirosinasa, gp75, c-Met, C-myc, Marti, MelanA, MUM-1, MUM-2, MUM-3, HLA-B7, Ep-CAM o una integrina asociada al cáncer, tal como la integrina $\alpha 5 \beta 3$. Como alternativa, la segunda molécula puede ser un antígeno de linfocitos T y/o células NK, tal como CD3 o CD16. La segunda molécula puede ser un factor angiogénico u otro factor de crecimiento asociado con el cáncer, tal como un factor de crecimiento endotelial vascular, un factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, angiogenina o un receptor de cualquiera de estos, en particular los receptores asociados con la progresión del cáncer (por ejemplo, otro de los receptores HER; HER1, HER3 o HER4). El segundo sitio de unión a antígeno puede unirse a un sitio diferente, preferentemente no bloqueante, en HER2 que el que está unido por el anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la segunda molécula puede proceder de la unión a HER2 de bloques cruzados de, trastuzumab, pertuzumab, F5 o C1.

Secuencias de ácido nucleico, vectores y células hospedadoras

En un aspecto adicional, la invención se refiere a secuencias de ácido nucleico, tales como secuencias de ADN, que codifican una secuencia de aminoácidos VH y VL seleccionadas del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y 5; 8 y 12; 15 y 19; 22 y 26; 29 y 33; 36 y 40; 43 y 44; 45 y 46; 47 y 48; 49 y 50; 51 y 52; 53 y 54; 55 y 56.

La presente divulgación también proporciona un vector de expresión, o un conjunto de vectores de expresión, que codifica un anticuerpo de la invención. La cadena pesada y ligera del anticuerpo puede estar codificada por el mismo vector o por un vector diferente.

5 Dichos vectores de expresión se pueden utilizar para la producción recombinante de anticuerpos de la invención.

El vector de expresión de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26, 29, 33, 36, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, y 56.

10 El vector de expresión de la presente divulgación puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos de VH seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 45, 47, 49, 51, 53, y 55.

15 El vector de expresión de la presente divulgación puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos de VL seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: SEQ ID NO: 5, 12, 19, 26, 33, 40, 44, 46, 48, 50, 52, 54, y 56.

20 El vector de expresión puede comprender además una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o ambas cadenas ligera y pesada de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo humano.

25 Un vector de expresión en el contexto de la presente divulgación puede ser cualquier vector adecuado, incluidos vectores de ácido nucleico cromosómico, no cromosómico y sintético (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de expresión). Los ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fagos, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores procedentes de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, y vectores de ácido nucleico viral (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo HER2 está comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe en, por ejemplo, Sykes y Johnston, *Nat Biotech* 17, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe en, por ejemplo, los documentos US 6.077.835 y/o WO 00/70087), un vector plásmido tal como pBR322, pUC 19/18, o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo "mosquito" (como se describe, por ejemplo, en Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, como una construcción precipitada con CaP04 (como se describe en, por ejemplo, el documento WO 00/46147, Benvenisty y Reshef, *PNAS* utiliza 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978), y Coraro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos son bien conocidos en la materia (véase, por ejemplo, los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

40 Los ejemplos de vectores de expresión para los anticuerpos de la invención también se describen en los Ejemplos 2 y 3.

45 El vector puede ser adecuado para la expresión del anticuerpo HER2 en una célula bacteriana. Los ejemplos de dichos vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem* 264, 5503-5509 (1989), vectores pET (Novagen, Madison WI) y similares).

50 Un vector de expresión también puede ser, o alternativamente, un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Se puede emplear cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisados en: F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), y Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987)).

55 Un vector de expresión también puede ser, o alternativamente, ser un vector adecuado para la expresión en células de mamíferos, por ejemplo, un vector que comprende glutamina sintetasa como un marcador seleccionable, tal como los vectores descritos en Bebbington (1992) *Biotechnology (NY)* 10:169-175.

60 Un ácido nucleico y/o vector también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de secreción/localización, que puede dirigir un polipéptido, tal como una cadena polipeptídica nascente, al espacio periplásmico o al medio de cultivo celular. Dichas secuencias son conocidas en la materia e incluyen péptidos señal o líder de secreción.

65 En un vector de expresión de la invención, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo HER2 pueden comprender o estar asociados con cualquier promotor, potenciador y otros elementos facilitadores de la expresión adecuados. Los ejemplos de dichos elementos incluyen fuertes promotores de expresión (por ejemplo, promotor/potenciador CMV IE humano así como RSV, SV40, SL3-3, MMTV y VIH LTR), secuencias de terminación poli (A) eficaces, un origen de replicación para productos plasmático en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos

como marcador seleccionable, y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en oposición a un promotor constitutivo tal como CMV IE.

- 5 En una realización, el vector de expresión que codifica el anticuerpo HER2 puede posicionarse y/o administrarse a la célula hospedadora o al animal hospedador mediante un vector viral.

10 En un aspecto aún más, la invención se refiere a una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante, tal como un transfectoma, que produce un anticuerpo de la invención como se define en el presente documento. Los ejemplos de células hospedadoras incluyen células de levaduras, bacterias y mamíferos, tales como células CHO o HEK. Por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo HER2 de la presente invención. La presente divulgación proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo HER2 de la invención.

15 En la presente divulgación se proporciona además un hibridoma que produce un anticuerpo de la invención como se define en el presente documento. En la presente divulgación se proporciona además un animal no humano o planta transgénica que comprende ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humana y una cadena ligera humana, en donde el animal o planta produce un anticuerpo de la invención.

20 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo HER2 de la invención, comprendiendo dicho método las etapas de

- 25 a) cultivar un hibridoma o una célula hospedadora de la invención como se describe anteriormente en el presente documento, y
b) purificar el anticuerpo de la invención a partir de los medios de cultivo.

Composiciones

30 En un aspecto principal adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

- un anticuerpo HER2 como se define en el presente documento, y
- un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 La composición farmacéutica de la presente invención puede contener un anticuerpo de la presente invención o una combinación de diferentes anticuerpos de la presente invención.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con técnicas convencionales tales como las desveladas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Una composición de la presente invención puede, por ejemplo, incluir diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizadores (por ejemplo, azúcares o aminoácidos libres de proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.

45 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes adecuados, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles con un compuesto de la presente invención. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y/o varios tampones. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersiones. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

60 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreto de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito de sodio, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

65 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro sódico en la composición.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración elegida, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, lo que puede aumentar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente invención se pueden preparar con vehículos que protejerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Dichos vehículos pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables y biocompatibles como el etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la materia. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones se conocen generalmente por los expertos en la materia.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes, por ejemplo, enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del principio activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos, por ejemplo, de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de métodos de preparación son el secado al vacío y el secado en frío (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

Los niveles reales de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones concretas de la presente invención utilizadas, o de la amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados junto con las composiciones concretas utilizadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, el estado de salud general e historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

La composición farmacéutica puede administrarse mediante cualquier vía y modo adecuado. Una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por vía parenteral. "Administrado por vía parenteral" como se utiliza en el presente documento significa modos de administración diferentes de la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección e incluye inyección epidural, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal e infusión.

La composición farmacéutica puede administrarse mediante infusión o inyección intravenosa o subcutánea.

Usos

En un aspecto principal adicional, la invención se refiere a un anticuerpo HER2 de la invención para su uso como un medicamento.

Los anticuerpos HER2 de la invención se pueden utilizar para varios propósitos. En particular, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para el tratamiento de diversas formas de cáncer, incluyendo cáncer metastásico y cáncer refractario.

En una realización, los anticuerpos HER2 de la invención se utilizan para el tratamiento de una forma de cáncer seleccionada del grupo que consiste en cáncer de mama, (incluyendo cáncer de mama primario, metastásico y refractario), cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, cáncer pancreático, cáncer testicular, melanoma maligno y un cáncer de tejidos blandos (por ejemplo, sarcoma sinovial).

El anticuerpo puede conjugarse con otra fracción.

El cáncer también puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de cuello de útero/endometrial, cáncer de pulmón, melanoma maligno, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer testicular, un tumor de tejidos blandos como el sarcoma sinovial y el cáncer de vejiga.

La presente divulgación proporciona además el uso de un anticuerpo monoclonal que se une al HER2 humano para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, como una de las indicaciones específicas para el cáncer mencionadas anteriormente.

Asimismo, la divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento del cáncer, como una

de las indicaciones de cáncer mencionadas anteriormente.

La eficacia del tratamiento proporcionado de acuerdo con la presente divulgación, puede controlarse durante la terapia, por ejemplo, en puntos predefinidos en el tiempo, mediante la determinación de la carga tumoral o los niveles de expresión de HER2 en las células tumorales relevantes.

Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y usos anteriores se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales pueden formularse en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación.

Las dosificaciones eficaces y los regímenes de dosificación para los anticuerpos HER2 dependen de la enfermedad o afección a tratar y pueden determinarse por los expertos en la materia. Un intervalo no limitativo ejemplar para una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención es aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-50 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,1-20 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-10 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,5, aproximadamente, tal como, 0,3, aproximadamente 1, aproximadamente 3, aproximadamente 5 o aproximadamente 8 mg/kg.

Un médico o veterinario que tenga experiencia en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o el veterinario podría empezar con dosis del anticuerpo HER2 empleado en la composición farmacéutica a niveles inferiores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta conseguir el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. La administración puede, por ejemplo, ser parenteral, tal como intravenosa, intramuscular o subcutánea. Los anticuerpos HER2 pueden administrarse por infusión en una dosis semanal de 10 a 500 mg/m², tal como de 200 a 400 mg/m². Dicha administración puede repetirse, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración se puede realizar por infusión continua durante un período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. Los anticuerpos HER2 pueden administrarse por infusión continua lenta durante un largo período, tal como más de 24 horas, para reducir los efectos secundarios tóxicos.

Los anticuerpos HER2 se pueden administrar en una dosis semanal de 250 mg a 2000 mg, tal como, por ejemplo, 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg o 2000 mg, hasta 8 veces, tal como de 4 a 6 veces. Dicho régimen se puede repetir una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosis puede determinarse o ajustarse mediante la medición de la cantidad de compuesto de la presente invención en la sangre tras la administración mediante, por ejemplo, la extracción de una muestra biológica y utilizando anticuerpos antiidiotipos que se dirigen a la región de unión al antígeno de los anticuerpos HER2 de la presente invención.

Los anticuerpos HER2 pueden administrarse mediante terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana por un período de 6 meses o más.

Un anticuerpo HER2 también se puede administrar profilácticamente para reducir el riesgo de desarrollar cáncer, retrasar la aparición de un evento en la progresión del cáncer y/o reducir el riesgo de recurrencia cuando el cáncer está en remisión.

Los anticuerpos HER2 también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes terapéuticos relevantes para la enfermedad o afección a tratar. Por consiguiente, el medicamento que contiene anticuerpo puede ser para combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un agente citotóxico, quimioterapéutico o anti-angiogénico.

Dicha administración combinada puede ser simultánea, separada o secuencial. Para la administración simultánea, los agentes pueden administrarse como una composición o como composiciones separadas, según sea adecuado.

Un agente terapéutico adicional para su uso junto con un anticuerpo HER2 de la presente divulgación puede seleccionarse de un antimetabolito, tal como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina, hidroxiaurea, asparaginasa, gemcitabina o cladribina.

Dicho agente terapéutico adicional también puede seleccionarse de un agente alquilante, tal como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbina, mitomicina C, cisplatino y otros derivados del platino, tales como carboplatino.

Dicho agente terapéutico adicional también puede seleccionarse de un agente antimitótico, tal como taxanos, por ejemplo, docetaxel y paclitaxel y alcaloides de la vinca, por ejemplo vindesina, vincristina, vinblastina y vinorelbina.

Dicho agente terapéutico adicional también puede seleccionarse de un inhibidor de topoisomerasa, como topotecán o irinotecán, o un fármaco citostático, como etopósido y tenipósido.

5 Dicho agente terapéutico adicional también puede seleccionarse de un inhibidor del factor de crecimiento, tal como un inhibidor de ErbB1 (EGFR) (tal como un anticuerpo EGFR, por ejemplo, zalutumumab, cetuximab, panitumumab o nimotuzumab u otros inhibidores de EGFR, tales como gefitinib o erlotinib), otro inhibidor de ErbB2 (HER2/neu) (tal como un anticuerpo HER2, por ejemplo, trastuzumab, trastuzumab-DM1 o pertuzumab) o un inhibidor de EGFR y HER2, tal como lapatinib).

10 Dicho agente terapéutico adicional también puede seleccionarse de un inhibidor de la tirosina cinasa, tal como imatinib (Glivec, Gleevec ST1571) o lapatinib, PTK787/ZK222584.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo HER2 de la presente invención puede administrarse con al menos un inhibidor de la angiogénesis, neovascularización y/u otra vascularización a un sujeto que lo necesite.
 15 Ejemplos de dichos inhibidores de la angiogénesis son inhibidores de la urocinasa, inhibidores de metaloproteasa de matriz (tales como marimastat, neovastat, BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 y agentes similares), inhibidores de migración y proliferación de células endoteliales (tales como TNP-470, escualamina, 2-metoxiestradiol, combretastatinas, endostatina, angiostatina, penicilamina, SCH66336 (Schering-Plough Corp, Madison, NJ), R115777 (Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ) y agentes similares), antagonistas de factores de crecimiento angiogénico (tales como ZD6474, SU6668, anticuerpos contra agentes angiogénicos y/o sus receptores (tales como VEGF (por ejemplo, bevacizumab), bFGF, y angiopoyetina-1), talidomida, análogos de talidomida (tales como CC-5013), Sugen 5416, SU5402, ribozima antiangiogénica (tal como angiozima), interferón α (tal como interferón α 2a), suramina y agentes similares), inhibidores de VEGF-R cinasa y otros inhibidores de tirosina cinasa anti-angiogénica (tales como SU011248), inhibidores de señalización de integrina/supervivencia específica de endotelio (tales como vitaxina y agentes similares), antagonistas/quelantes de cobre (tales como tetratiomolibdato, captopril y agentes similares), carboxiamido-triazol (CAI), ABT-627, CM101, interleucina-12 (IL-12), IM862, PNU145156E así como moléculas de nucleótidos que inhiben la angiogénesis (tales como ADNc antisentido de VEGF, ADNc que codifica angiostatina, ADNc que codifica p53 y ADNc que codifica el receptor-2 deficiente de VEGF).

30 Otros ejemplos de dichos inhibidores de angiogénesis, neovascularización y/u otra vascularización son derivados antiangiogénicos de heparina (por ejemplo, heparinasa III), temozolomida, NK4, factor inhibidor de migración de macrófagos, inhibidores de ciclooxigenasa-2, inhibidores de factor 1 inducible por hipoxia, isoflavonas antiangiogénicas de soja, oltipraz, fumagilina y análogos de los mismos, análogos de somatostatina, polisulfato de pentosán, tecogalan sodio, dalteparina, tumstatina, trombospondina, NM-3, combrestatina, canstatina, avastatina, anticuerpos contra otras dianas, tales como la integrina anti-alfa-v/beta-3 y los anticuerpos anti-cinostatina.

Un agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para tratar los trastornos como se describió anteriormente puede ser un inmunógeno contra el cáncer, tal como un antígeno de cáncer/antígeno asociado a tumor (por ejemplo, una molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM/TACSTD1), mucina 1 (MUC1), antígeno carcinoembrionario (CEA), glucoproteína asociada a tumor 72 (TAG-72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, vacunas virales asociadas con el cáncer (por ejemplo, vacunas contra el virus del papiloma humano) o las proteínas de choque térmico procedentes de tumores.

45 El agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para tratar los trastornos como se describe anteriormente también puede ser una citocina, quimiocina o combinación de las mismas contra el cáncer. Los ejemplos de citocinas y factores de crecimiento adecuados incluyen IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN α (por ejemplo, INF α 2b), IFN β , GM-CSF, CD40L, ligando de Flt3, factor de células madre, aneastim, y TNF α . Las quimiocinas adecuadas pueden incluir quimiocinas negativas Glu-Leu-Arg (ELR), tales como IP-10, MCP-3, MIG y SDF-1 α de las familias de quimiocinas CXC y C-C humanas. Las citocinas adecuadas incluyen derivados de citocinas, variantes de citocinas, fragmentos de citocinas y proteínas de fusión de citocinas.

Un agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para tratar los trastornos como se describe anteriormente puede ser un regulador del control del ciclo celular/apoptosis (o "agente regulador"). Un regulador del control del ciclo celular/apoptosis puede incluir moléculas que se dirigen y modulan los reguladores del control del ciclo celular/apoptosis, tales como (i) cdc-25 (tal como NSC 663284), (ii) cinasas dependientes de ciclina que estimulan en exceso el ciclo celular (tal como flavopiridol (L868275, HMR1275), 7-hidroxiestaurosporina (UCN-01, KW-2401), y roscovitina (R-roscovitina, CYC202)), y (iii) moduladores de telomerasa (como BIBR1532, SOT-095, GRN163 y composiciones descritas en, por ejemplo, los documentos US 6.440.735 y US 6.713.055). Entre los ejemplos no limitativos de moléculas que interfieren con las vías apoptóticas se incluyen el ligando inductor de la apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL)/ligando de la apoptosis-2 (Apo-2L), los anticuerpos que activan los receptores de TRAIL, los IFN y el Bcl-2 antisentido.

65 Un agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para tratar los trastornos como se describió anteriormente puede ser un agente regulador hormonal, tales como agentes útiles para la terapia anti-andrógeno y anti-estrógeno. Ejemplos de dichos agentes reguladores hormonales son tamoxifeno, idoxifeno,

fulvestrant, droloxifeno, toremifeno, raloxifeno, dietilestilbestrol, etinilestradiol/etinilo, un antiandrógeno (tal como flutamida/eulexin), una progestina (tal como caproato de hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona/provera, megestrol acetato/megace), un adrenocorticosteroide (tal como hidrocortisona, prednisona), hormona liberadora de hormona luteinizante (y análogos de la misma y otros agonistas de la LHRH, como la buserelina y la goserelina), un inhibidor de la aromataza (tal como anastrozol/arimidex, aminoglutetimida/citradeno, exemestano) o un inhibidor de hormonas (tal como ocreótido/-sandostatina).

Un agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para tratar los trastornos como se describió anteriormente puede ser un agente antianérgico, tal como compuestos que son moléculas que bloquean la actividad de CTLA-4, por ejemplo, ipilimumab.

Un agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para tratar los trastornos como se describió anteriormente puede ser un ácido nucleico anticáncer o una molécula de ARN inhibidora de cáncer.

Ejemplos de otros agentes anticancerígenos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para tratar los trastornos como se describió anteriormente son los agentes inductores de la diferenciación, análogos de ácido retinoico (tal como todo el ácido transretinoico, ácido 13-cis retinoico y agentes similares), análogos de la vitamina D (tales como seocalcitol y agentes similares), inhibidores de ErbB3, ErbB4, IGF-IR, receptor de insulina, PDGFR α , PDGFR β , Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, RON (tal como un anticuerpo antiRON), Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7 y agentes similares.

Ejemplos de otros agentes anticancerígenos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para tratar los trastornos como se describió anteriormente son estramustina y epirubicina.

Ejemplos de otros agentes anticancerígenos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para tratar los trastornos como se describió anteriormente son un inhibidor de HSP90 como 17-*alil* amino geld-anamicina, anticuerpos dirigidos contra un antígeno tumoral como PSA, CA125, KSA, integrinas, por ejemplo, integrina β 1, o inhibidores de VCAM.

Ejemplos de otros agentes anticancerígenos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para tratar los trastornos como se describió anteriormente son los inhibidores de la calcineurina (tales como valspodar, PSC 833 y otros MDR-1 o inhibidores de p-glucoproteína), inhibidores de TOR (tales como sirolimus, everolimus y rapamcyin) e inhibidores de los mecanismos de "aniquilación de linfocitos" (tal como FTY720), y agentes con efectos en la señalización celular, tales como los inhibidores de moléculas de adhesión (por ejemplo, anti-LFA).

El anticuerpo HER2 de la invención puede ser para uso en combinación con uno o más anticuerpos terapéuticos, tales como ofatumumab, zanolimumab, daratumumab, ranibizumab, Zenapax, Simulect, Remicade, Humira, Tysabri, Xolair, Raptiva y/o Rituximab.

Se pueden utilizar dos o más anticuerpos diferentes de la invención como se describe en el presente documento en combinación para el tratamiento de la enfermedad. Las combinaciones particularmente interesantes incluyen dos o más anticuerpos no bloqueantes. Dicha terapia de combinación puede conducir a la unión de un número incrementado de moléculas de anticuerpo por célula, lo que puede aumentar la eficacia, por ejemplo, a través de la activación de la lisis mediada por complemento.

Además de lo anterior, otras divulgaciones de terapias de combinación incluyen lo siguiente:

Para el tratamiento del cáncer de mama, un anticuerpo HER2 o un conjugado terapéutico del mismo, en combinación con metotrexato, paclitaxel, doxorubicina, carboplatino, ciclofosfamida, daunorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, ixabepilona, mutamicina, mitoxantrona, vinorelbina, docetaxel, tiotepa, vincristina, capecitabina, un anticuerpo EGFR (por ejemplo, zalutumumab, cetuximab, panitumumab o nimotuzumab) u otro inhibidor de EGFR (tal como gefitinib o erlotinib), otro anticuerpo HER2 o conjugado (tal como, por ejemplo, trastuzumab, trastuzumab-DM1 o pertuzumab), un inhibidor de EGFR y HER2 (tal como lapatinib), y/o en combinación con un inhibidor de HER3.

Para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas, un anticuerpo HER2 en combinación con inhibidores de EGFR, tales como un anticuerpo EGFR, por ejemplo, zalutumumab, cetuximab, panitumumab o nimotuzumab u otros inhibidores de EGFR (tales como gefitinib o erlotinib), o en combinación con otro agente HER2 (tal como un anticuerpo HER2, por ejemplo, trastuzumab, trastuzumab-DM1 o pertuzumab) o en combinación con un inhibidor de EGFR y HER2, tal como lapatinib, o en combinación con un inhibidor de HER3.

Para el tratamiento del cáncer colorrectal, un anticuerpo HER2 en combinación con uno o más compuestos seleccionados de: gemcitabina, bevacizumab, FOLFOX, FOLFIRI, XELOX, IFL, oxaliplatino, irinotecán, 5-FU/IV, capecitabina, UFT, agentes dirigidos a EGFR, tales como cetuximab, panitumumab, zalutumumab; inhibidores de

VEGF, o inhibidores de la tirosina cinasa, tal como sunitinib.

Para el tratamiento del cáncer de próstata, un anticuerpo HER2 en combinación con uno o más compuestos seleccionados de: terapias hormonales/antihormonales; tales como antiandrógenos, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH, por sus siglas en inglés) y quimioterapéuticos, tales como taxanos, mitoxantrona, estramustina, 5FU, vinblastina, e ixabepilona.

Radioterapia - cirugía

La presente divulgación-inención proporciona el uso de un anticuerpo HER2, tal como un anticuerpo HER2 de la presente invención, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer que se va a administrar en combinación con radioterapia.

La radioterapia puede comprender la radiación o se proporciona la administración asociada de radiofármacos a un paciente. La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente que se está tratando (el tratamiento de radiación puede, por ejemplo, ser en forma de radioterapia de haz externo (EBRT, de sus siglas en inglés) o braquiterapia (BT, de sus siglas en inglés)). Los elementos radiactivos que pueden utilizarse en la práctica de tales métodos incluyen, por ejemplo, radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yoduro-123, yoduro-131 e indio-111.

Usos diagnósticos

Los anticuerpos HER2 de la invención también pueden utilizarse para fines de diagnóstico. Por tanto, la invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo HER2 como se define en el presente documento.

Los anticuerpos HER2 de la presente invención se pueden utilizar *in vivo* o *in vitro* para diagnosticar enfermedades en donde las células activadas que expresan HER2 desempeñan un papel activo en la patogénesis, mediante la detección de los niveles de HER2 o los niveles de células que contienen HER2 en la superficie de su membrana. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la puesta en contacto de una muestra para analizar, opcionalmente junto con una muestra de control, con el anticuerpo HER2 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y HER2.

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para detectar la presencia de antígeno HER2, o una célula que expresa HER2, en una muestra que comprende:

- poner en contacto la muestra con un anticuerpo HER2 de la invención en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y HER2; y
- analizar si se ha formado un complejo.

Este método pueden realizarse *in vitro*.

Más concretamente, la presente divulgación proporciona métodos para la identificación y el diagnóstico de células y tejidos invasivos y otras células a las que se dirigen los anticuerpos HER2 de la presente invención, y para el monitoreo del progreso de los tratamientos terapéuticos, el estado después del tratamiento, el riesgo de cáncer en desarrollo, progresión del cáncer, y similares.

Los marcadores adecuados para el anticuerpo HER2 y/o anticuerpos secundarios utilizados en dichas técnicas son bien conocidos en la materia.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit para detectar la presencia de antígeno HER2, o una célula que expresa HER2, en una muestra que comprende

- un anticuerpo HER2 de la invención o una molécula biespecífica de la invención; e
- instrucciones de uso del kit.

La presente divulgación proporciona además un kit para el diagnóstico de cáncer que comprende un recipiente que comprende un anticuerpo HER2 y uno o más reactivos para detectar la unión del anticuerpo HER2 a HER2. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos u otros marcadores detectables. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para reacciones enzimáticas, en donde las reacciones enzimáticas producen un producto que puede visualizarse.

Anticuerpos antiidiotipo

La presente divulgación también se refiere a un anticuerpo antiidiotipo que se une a un anticuerpo HER2 de la invención como se describe en el presente documento.

Un anticuerpo "antiidiotipo" (Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo Id se puede preparar mediante la inmunización de un animal de la misma especie y tipo genético como la fuente de un mAb HER2 con el mAb para el cual se está preparando un anti-Id. El animal inmunizado normalmente puede reconocer y responder a los determinantes idiotipos del anticuerpo inmunizante mediante la producción de un anticuerpo de estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id).

Un anticuerpo anti-Id también se puede utilizar como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal, produciendo el llamado anticuerpo anti-anti-Id. Un anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al mAb original, lo que indujo al anti-Id. Por tanto, mediante el uso de anticuerpos contra los determinantes idiotípicos de un mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de idéntica especificidad.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no debe interpretarse como limitante del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Construcciones de expresión para HER2 y variantes del HER2

Se generaron construcciones completamente optimizadas con codones para la expresión de HER2 de longitud completa (1255 aa, Swissprot P04626), el dominio extracelular (ECD, de sus siglas en inglés) de HER2 (Her2-ECDHis, aa 1-653 con un marcador His6 en C-terminal), la variante de empalme HER2 de origen natural (Her2-delex16, resultante de la eliminación del exón 16 y que carece de los aa 633-648) y una forma truncada del receptor HER2 (Her2-achaparrado, aa 648-1256). La construcción contenía sitios de restricción adecuados para la clonación y una secuencia de Kozak óptima (Kozak, M., Gene 1999;234(2): 187-208.). Las construcciones se clonaron en el vector de expresión de mamífero pEE13.4 (Lonza Biologics; Bebbington, C. R., et al., Biotechnology (NY) 1992; 10(2):169-75) y se secuenciaron completamente para confirmar la exactitud de la construcción.

Ejemplo 2 - Construcciones de expresión para pertuzumab, C1 y F5

Se generaron construcciones completamente optimizadas con codones para la expresión de la cadena pesada (HC, de sus siglas en inglés) y la cadena ligera (LC, de sus siglas en inglés) de los anticuerpos IgG1 pertuzumab, C1 y F5 en células HEK. Las regiones variables codificadas mediante estas construcciones son idénticas a las descritas en la Patente de Estados Unidos N.º 6.949.245 para cadena pesada y ligera de pertuzumab y la Patente de Estados Unidos N.º 7.244.826 para cadena pesada y ligera de C1 y F5. Para C1 y F5, se utilizaron los vectores de expresión de mamíferos p33G1f y p33K o p33L (pcDNA3.3 (Invitrogen)) que contienen la región constante completamente optimizada con codones para la cadena pesada de IgG1 humana (alotipo f), la cadena ligera kappa humana o la cadena ligera lambda humana, respectivamente. Para pertuzumab, se utilizaron los vectores de expresión de mamíferos pG1f (pEE12.4 (Lonza Biologics) y pKappa (pEE6.4 (Lonza Biologics)), que contienen la región constante completamente optimizada con codones para la cadena pesada de IgG1 humana (alotipo f) y la cadena ligera kappa humana, respectivamente.

El trastuzumab (Herceptin®) se puede producir de la misma manera, utilizando las secuencias de cadenas pesada y ligera descritas en, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 7.632.924.

Ejemplo 3 - Expresión transitoria en células HEK-293 o CHO

Se obtuvieron células Freestyle™ 293-F (un subclón HEK-293 adaptado al crecimiento en suspensión y medio Freestyle químicamente definido, (HEK-293F)) de Invitrogen y se transfectaron con el ADN plasmídico apropiado, utilizando 293fectin (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el caso de la expresión de anticuerpos, se coexpresaron los vectores de expresión de cadena pesada y ligera apropiados.

pEE13.4Her2, pEE13.4Her2-delex16 y pEE13.4Her2-achaparrado se transfectaron transitoriamente en la línea celular Freestyle™ CHO-S (Invitrogen) utilizando el reactivo de transfección Freestyle MAX (Invitrogen). La expresión de HER2 y Her2-delex16 se probó mediante análisis FACS como se describe a continuación.

Ejemplo 4 - Expresión de grupo policlonal estable en NS0

pEE13.4Her2, pEE13.4Her2-delex16 y pEE13.4Her2-achaparrado se transfectaron de forma estable en células NS0 mediante nucleofección (Amaxa). Se estableció un grupo de células transfectadas de manera estable después de la selección en el crecimiento dependiente de glutamina, basado en el marcador integrado de selección de glutamina sintetasa (Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 2000;32(2):109-123).

Ejemplo 5 - Purificación de HER2 marcado con His

Her2ECDHis se expresó en células HEK-293F. El marcador His en Her2ECDHis permitió la purificación con

cromatografía de afinidad con metales inmovilizados, ya que la proteína marcada con His se une fuertemente a las perlas de resina, mientras que otras proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo no se unen fuertemente.

En este proceso, un quelante fijado en la resina cromatográfica se cargó con cationes Co^{2+} . el sobrenadante que contenía Her2ECDHis se incubó con la resina en modo discontinuo (es decir, solución). Después de la incubación, las perlas se recuperaron del sobrenadante y se empaquetaron en una columna. La columna se lavó para eliminar las proteínas débilmente unidas. Las proteínas Her2ECDHis fuertemente unidas se eluyeron luego con un tampón que contenía imidazol, que compite con la unión de His a Co^{2+} . El eluyente se eliminó de la proteína mediante intercambio de tampón en una columna de desalinización.

Ejemplo 6 - Procedimiento de inmunización de ratones transgénicos

Los anticuerpos 005, 006, 041, 044, 059, 060, 067, 072, 093, 106 y 111 se derivaron del siguiente procedimiento de inmunización: dos ratones hembras HCo12, un ratón hembra y uno macho HCo12-Balb/C, un ratón hembra y uno macho HCo17, y dos ratones macho HCo20 (Medarex, San José, CA, EE.UU.) se inmunizaron cada quince días, alternando entre 5×10^6 células NS0 transfectadas de forma transitoria con Her2ECD intraperitoneal (IP) y 20 μg de proteína Her2ECDHis acoplada al hapteno de hemocianina de lapa californiana (KLH, de sus siglas en inglés) subcutánea (SC) en la base de la cola. Se realizó un máximo de ocho inmunizaciones por ratón (cuatro inmunizaciones IP y cuatro inmunizaciones SC). La primera inmunización con células se realizó en adyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.). Para todas las demás inmunizaciones, las células se inyectaron IP en PBS y se inyectó KLH acoplado Her2ECD SC utilizando adyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.).

El anticuerpo 150 se derivó de la inmunización de un ratón hembra HCo17 (Medarex) alternando con 5×10^6 células NS0 transfectadas transitoriamente con Her2delex16 IP y 20 μg de proteína Her2ECDHis acoplada al hapteno de hemocianina de lapa californiana (KLH) SC en la base de la cola, con un intervalo de catorce días. Se realizó un máximo de ocho inmunizaciones (cuatro inmunizaciones IP y cuatro inmunizaciones SC). La primera inmunización con células se realizó en adyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.). Para todas las demás inmunizaciones, las células se inyectaron IP en PBS y se inyectó KLH acoplado Her2ECD SC utilizando adyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.).

El anticuerpo 163 se derivó de la inmunización de un ratón macho HCo20 (Medarex) con 20 μg de proteína Her2ECDHis acoplada al hapteno de hemocianina de la lapa californiana (KLH), alternando IP y SC en la base de la cola con un intervalo de catorce días. Se realizó un máximo de ocho inmunizaciones (cuatro inmunizaciones IP y cuatro inmunizaciones SC). La primera inmunización se realizó IP en adyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.). Las otras inmunizaciones se inyectaron con un adyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.).

Los ratones con al menos dos títulos secuenciales contra TC1014-Her2, TC1014-Her2delex16 o TC1014-Her2 achaparrado en el ensayo de detección de FMAT específico de antígeno (como se describe en el Ejemplo 7), se consideraron positivos y fusionados.

Ejemplo 7 - Ensayo de detección específico de antígeno homogéneo

La presencia de anticuerpos HER2 en sueros de ratones inmunizados o hibridoma HuMab (anticuerpo monoclonal humano) o sobrenadante de cultivo de transfectoma se determinó mediante ensayos homogéneos de detección de antígenos específicos (cuatro cuadrantes) utilizando tecnología de ensayo de micro volumen fluorométrico (FMAT; Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Para ello, se utilizó una combinación de 4 ensayos basados en células. Se determinó la unión a TC1014-Her2 (células HEK-293F que expresan de forma transitoria el receptor HER2; producido como se describió anteriormente), TC1014-Her2delex16 (células HEK-293F que expresan de forma transitoria el dominio extracelular de Her2-delex (un mutante de delección de 16 aminoácidos del receptor HER2; producido como se describió anteriormente) y TC1014-Her2 achaparrado (células HEK-293F que expresan de forma transitoria el dominio achaparrado extracelular del receptor HER2; producido como se describió anteriormente), así como las células de tipo silvestre HEK293 (células de control negativo que no expresan HER2). Se agregaron muestras a las células para permitir la unión a HER2. Posteriormente, se detectó la unión de HuMab utilizando un conjugado fluorescente (anti-IgG-Cy5 humana de cabra; Jackson ImmunoResearch). TH1014-Pertuzumab (producido en células HEK-293F) se usó como control positivo y el suero combinado de HuMab de ratón y HuMab-KLH se utilizaron como controles negativos. Las muestras se escanearon utilizando un sistema de detección celular Applied Biosystems 8200 (8200 CDS) y se utilizaron los recuentos x fluorescencia como lectura. Las muestras se declararon positivas cuando los recuentos fueron superiores a 50 y los recuentos x fluorescencia fueron al menos tres veces mayores que el control negativo.

Ejemplo 8 - Generación de hibridomas de HuMab

Se sacrificaron ratones HuMab con un desarrollo de títulos específico de antígeno suficiente (definido anteriormente) y se recogieron el bazo y los ganglios linfáticos que flanquean la aorta abdominal y la vena cava. La fusión de

esplenocitos y células de ganglios linfáticos a una línea celular de mieloma de ratón se realizó mediante electrofusión utilizando un sistema de electrofusión CEEF 50 (Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, EE.UU.), esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, los pocillos primarios se subclonaron utilizando el sistema ClonePix (Genetix, Hampshire, Reino Unido). Con este fin, se sembraron hibridomas de pocillos primarios específicos en medio semisólido hecho de CloneMedia al 40 % (Genetix, Hampshire, Reino Unido) y medio completo HyQ 2x al 60 % (Hyclone, Waltham, EE.UU.). Los subclones se volvieron a probar en el ensayo de unión específica a antígeno como se describe en el Ejemplo 7 y los niveles de IgG se midieron utilizando un Octet (Fortebio, Menlo Park, EE.UU.) para seleccionar el clon más específico y el que mejor produce por pocillo primario para una expansión adicional. La expansión y el cultivo adicionales de los hibridomas de HuMab resultantes se realizaron en base a protocolos estándar (por ejemplo, como se describe en Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. y Strober, W., ed. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006). Los clones procedentes de este proceso se designaron PC1014.

15 **Ejemplo 9 - Espectrometría de masas de anticuerpos purificados**

Se purificaron pequeñas alícuotas de 0,8 ml de anticuerpo que contenía sobrenadante de 6 pocillos o fase de Hyperflask utilizando columnas PhyTip que contenían resina de Proteína G (PhyNexus Inc., San José, EE.UU.) en una estación de trabajo Sciclone ALH 3000 (Caliper Lifesciences, Hopkinton, EE.UU.). Las columnas PhyTip se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, aunque los tampones se reemplazaron por: tampón de unión PBS (B. Braun, Medical B.V., Oss, Países Bajos) tampón de elución HCl-Glicina 0,1M pH 2,7 (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Alemania). Después de la purificación, las muestras se neutralizaron con Tris-HCl 2M, pH 9,0 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). Como alternativa, en algunos casos se purificaron grandes volúmenes de sobrenadante de cultivo utilizando MabSelect SuRe.

25 Después de la purificación, las muestras se colocaron en una placa de 384 pocillos (Waters, placa de pocillos cuadrados de 100 µl, pieza n.º 186002631). Las muestras se desglucosilaron durante la noche a 37 °C con N-glucosidasa F (nº de cat. 11365177001 de Roche). Se añadió DTT (15 mg/ml) (1 µl/pocillo) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Las muestras (5 o 6 µl) se desalaron en una Acquity UPLC™ (Waters, Milford, EE.UU.) con una columna BEH300 C18 de 1,7 µm, 2,1 x 50 mm a 60 °C. El agua MQ y el acetonitrilo de grado LC-MS (Biosolve, nº de cat. 01204101, Valkenswaard, Países Bajos) con ácido fórmico al 0,1 % (Fluka, nº de cat. 56302, Buchs, Alemania), se utilizaron como eluyentes A y B, respectivamente. Los espectros de masas de ionización por electropulverización en tiempo de vuelo se registraron en línea en un espectrómetro de masas micrOTOF™ (Bruker, Bremen, Alemania) que funciona en el modo de ión positivo. Antes del análisis, se calibró una escala de 900-3000 m/z con la mezcla de sintonización ES (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.). Los espectros de masas se desconvolucionan con el software DataAnalysis™ v. 3.4 (Bruker) utilizando el algoritmo de Entropía Máxima en busca de pesos moleculares entre 5 y 80 kDa.

Después de la desconvolución, se compararon las masas de las cadenas pesada y ligera resultantes para todas las muestras con el fin de encontrar anticuerpos duplicados. Esto se debió a veces a la presencia de una cadena extra ligera, pero en la comparación de las cadenas pesadas, también se tuvo en cuenta la posible presencia de variantes de lisina en C-terminal. Esto dio como resultado una lista de anticuerpos únicos, es decir, una combinación única de cadenas pesadas y ligeras específicas. En el caso de que se encontraran anticuerpos duplicados, se seleccionó un anticuerpo único en base a los resultados de otras pruebas.

45 **Ejemplo 10 - Análisis de secuencia de los dominios variables del anticuerpo HER2 y clonación en vectores de expresión**

El ARN total de los HuMabs HER2 se preparó a partir de 5×10^6 células de hibridoma y el ADN complementario 5'-RACE (ADNc) se preparó a partir de 100 ng de RNA total, utilizando el kit de Amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las regiones codificantes de VH y VL se amplificaron mediante PCR y se clonaron directamente, en fase, en los vectores de expresión pG1f y pKappa, mediante clonación independiente de la ligación (Aslanidis, C. y P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990; 18(20): 6069-74). Los clones procedentes de este proceso se designaron TH1014. Para cada anticuerpo, se secuenciaron 16 clones VL y 8 clones VH. Los clones que predijeron la masa de la cadena pesada y ligera de acuerdo con la masa del material derivado del hibridoma del mismo anticuerpo (según lo determinado mediante espectrometría de masas) se seleccionaron para su estudio y expresión adicionales.

Las secuencias resultantes se muestran en las Figuras 1 y 2 y en el Listado de secuencias. Las secuencias seleccionadas también se describen con más detalle a continuación. Las secuencias de CDR se definieron de acuerdo con IMGT (Lefranc MP. Et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999 y Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)). La Tabla 1, la Tabla 2 y la Tabla 3 dan una visión general de la información de la secuencia del anticuerpo o las secuencias de la línea germinal, y la Tabla 4 muestra las secuencias consenso.

ES 2 718 821 T3

Tabla 1: Secuencias de la región variable de la cadena pesada (VH), región variable de la cadena ligera (VL) y CDR de los HuMabs 005, 006, 059, 060, 106 y 111.

SEQ ID NO: 1	VH 005	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFHFYWIGW VRQMPGKGLEWMGSIYPGDS DTRYRPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWTS LKASDTAIYYCARQRGDY YFYGM DVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 2	VH 005, CDR1	GYSFHFYW
SEQ ID NO: 3	VH 005, CDR2	IYPGSDST
SEQ ID NO: 4	VH 005, CDR3	ARQRGDY YFYGM DV
SEQ ID NO: 5	VL 005	EIVLTQSPGTL S LSPGERATL SCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQVPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQYGSS-LTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 6	VL 005, CDR1	QSVSSSY
	VL 005, CDR2	GAS
SEQ ID NO: 7	VL 005, CDR3	QQYGSSLT
SEQ ID NO: 8	VH 006	EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYALIWW RQAPGKGLEWVSIIRGGAGSTYYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARIWGPLFDYW GQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 9	VH 006, CDR1	GFTFSNYA
SEQ ID NO: 10	VH 006, CDR2	IRGGAGST
SEQ ID NO: 11	VH 006, CDR3	AKARIWGPLFDY
SEQ ID NO: 12	VL 006	EIVLTQSPATL S LSPGERATL SCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 13	VL 006, CDR1	QSVSSY
	VL 006, CDR2	DAS
SEQ ID NO: 14	VL 006, CDR3	QQRSNWPPLT
SEQ ID NO: 15	VH 059	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVPCKASGYTFTRYGISW VRQAPGQGLEWMGWISAYNGKTYA QKLQGRVTMT TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSPLLWFEELY FDYWGGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 16	VH 059, CDR1	GYTFTRYG
SEQ ID NO: 17	VH 059, CDR2	ISAYNGKT
SEQ ID NO: 18	VH 059, CDR3	ARSPLLWFEELYFDY
SEQ ID NO: 19	VL 059	EIVLTQSPGTL S LSPGERATL SCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQYGTSLFTFGPGTKVDIK
SEQ ID NO: 20	VL 059, CDR1	QSVSSY
	VL 059, CDR2	GAS
SEQ ID NO: 21	VL 059, CDR3	QQYGTSLFT
SEQ ID NO: 22	VH 060	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGSIYPGDSYTRNSPSFQGQVTISA DKSIATAYLQWNSL KASDTAMYYCARHAGDFYFDG LDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 23	VH 060, CDR1	GYRFTTSYW

ES 2 718 821 T3

SEQ ID NO: 24	VH 060, CDR2	IYPGDSYT
SEQ ID NO: 25	VH 060, CDR3	ARHAGDFYYFDGLDV
SEQ ID NO: 26	VL 060	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQYQYSSPPITFGQGTTRLEIK
SEQ ID NO: 27	VL 060, CDR1	QSVSSSY
	VL 060, CDR2	GAS
SEQ ID NO: 28	VL 060, CDR3	QQYQYSSPPIT
SEQ ID NO: 29	VH 106	EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTRYWIGW VRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLTGDRGFDYY SGMDVWGQGT TTVTVSS
SEQ ID NO: 30	VH 106, CDR1	GYSFTRYW
SEQ ID NO: 31	VH 106, CDR2	IYPGDSDT
SEQ ID NO: 32	VH 106, CDR3	ARLTGDRGFDYYSGMDV
SEQ ID NO: 33	VL 106	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQYQYSS-FTFGPGTKVDIK
SEQ ID NO: 34	VL 106, CDR1	QSVSSSY
	VL 106, CDR2	GAS
SEQ ID NO: 35	VL 106, CDR3	QQYQYSSFT
SEQ ID NO: 36	VH 111	QVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVCKASGGTFSSYGISW VRQAPGPGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITAD KSTNTAYMELSSLRSED TAVYYCARDQEYSSNWWWY GQGT LTVTVSS
SEQ ID NO: 37	VH 111, CDR1	GGTFSSYG
SEQ ID NO: 38	VH 111, CDR2	IIPILGIA
SEQ ID NO: 39	VH 111, CDR3	ARDQEYSSNWWWY
SEQ ID NO: 40	VL 111	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQLYGSSPTFGPGTKVDIK
SEQ ID NO: 41	VL 111, CDR1	QSVRSSY
	VL 111, CDR2	GAS
SEQ ID NO: 42	VL 111, CDR3	QLYGSSPT

Tabla 2: Origen del ratón y homologías de secuencia de la cadena pesada y ligera de los HuMabs 005, 006, 059, 060, 106 y 111.

HuMab:	Ratón:	Cepa:	VH de la línea germinal:	VL de la línea germinal:
005	350611	HCo12-BalbC	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
006	350611	HCo12-BalbC	IgHV3-23-1	IgKV3-11-01
059	350654	HCo17	IgHV1-18-1	IgKV3-20-01
060	350654	HCo17	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
106	350660	HCo17	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
111	350660	HCo17	IgHV1-69-4	IgKV3-20-01

ES 2 718 821 T3

Tabla 3: Secuencias de la región variable de la cadena pesada (VH), región variable de la cadena ligera (VL) de los HuMabs 041, 150, 067, 072, 163, 093 y 044. Las respectivas CDR corresponden a las subrayadas en las Figuras 1 y 2, para las secuencias VH y VL, respectivamente.

SEQ ID NO: 43	VH 041	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGSIYPGDSHTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARQKGFYFFGLDVWGQGTAITVSS
SEQ ID NO: 44	VL 041	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 45	VH 150	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGSIYPGDSHTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARQAGDYNNYNGMDVWGQGTITVTVSS
SEQ ID NO: 46	VL 150	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLTWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 47	VH 067	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARQKGDYYYHYGLDVWGQGTITVTVSS
SEQ ID NO: 48	VL 067	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSPRLTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 49	VH 072	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARQKGDYYYFNGLDVWGQGTITVTVSS
SEQ ID NO: 50	VL 072	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSPRLTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 51	VH 163	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFISYWIGWVRQMPGKGL EWMGRIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISVDKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARQRGDYYYFNGLDVWGQGTITVTVSS
SEQ ID NO: 52	VL 163	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 53	VH 093	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGRIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSITAYLQWSSLRASDT AMYYCARQRGDYYYFFGLDIWGQGTITVTVSL
SEQ ID NO: 54	VL 093	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 55	VH 044	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFSSYWIGWVRQMPGKGL EWMGSIFPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSITAYLQWSSLKASDT AMYYCARQAGDYNNYNGMDVWGQGTITVTVSS
SEQ ID NO: 56	VL 044	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGKVEIK

Tabla 4: Las CDR consenso se basan en las alineaciones de secuencia que se muestran en las Figuras 1 y 2.

SEQ ID NO: 57 005-060-106-041-150-067-072-163-093-044	IgHV5-51-1	CDR1 de VH	GYY1FX2X3YW	en donde X1 = S o R; X2 = S, T, H, o I; y X3 = S, R, o F; preferentemente, en donde X2 = H o T
SEQ ID NO: 58 005-060-106-041-150-067-072-163-093-044	IgHV5-51-1	CDR2 de VH	IX1PGDSX2T	en donde X1 = Y o F; X2 = D, Y, o H preferentemente, en donde X2 = D o Y
SEQ ID NO: 59 005-060-106-041-150-067-072-163-093-044	IgHV5-51-1	CDR3 de VH	ARX1X2X3X4X5X 6X7X8YX9X10GX 11DX12	en donde X1 = Q, H, o L; X2 = R, A, T, o K; X3 = G; X4 = D; X5 = R o ninguno; X6 = G o ninguno; X7 = Y o F; X8 = Y o D; X9 = Y, F, o H; X10 = Y, D, S, F, o N; X11 = M o L; y X12 = V o I; preferentemente, en donde X1 = Q, X2 = R o A; X5 = X6 = ninguno; X7 = Y o F; X8 = Y; X9 = F; X10 = Y; y X12 = V
SEQ ID NO: 60 006	IgHV3-23-1	CDR1 de VH	GFTFSXYA	en donde X = N o S, preferentemente N
SEQ ID NO: 61 006	IgHV3-23-1	CDR2 de VH	IX1GX2X3GST	en donde X1 = R o S; X2 = G o S; y X3 = A o G, preferentemente en donde X1 = R; X2 = G; y X3 = A
SEQ ID NO: 62 006	IgHV3-23-1	CDR3 de VH	AKRIWGPXFDY	en donde X = L o Y, preferentemente L
SEQ ID NO: 63 059	IgHV1-18-1	CDR1 de VH	GYTFTXYG	en donde X = R o S, preferentemente R
SEQ ID NO: 64 059	IgHV1-18-1	CDR2 de VH	ISAYNGXT	en donde X = K o N, preferentemente K
SEQ ID NO: 65 059	IgHV1-18-1	CDR3 de VH	ARSPLLWFEELYF DY	
SEQ ID NO: 66 111	IgHV1-69-4	CDR1 de VH	GGTFSSYX	en donde X = G o A, preferentemente G
SEQ ID NO: 38 111	IgHV1-69-4	CDR2 de VH	IIPILGIA	
SEQ ID NO: 67 111	IgHV1-69-4	CDR3 de VH	ARDQEYSSX1X2 X3	en donde X1 = N o Y; X2 = W o F; y X3 = Y o D, preferentemente en donde X1 = N; X2 = W; y X3 = Y
SEQ ID NO: 68 005-059-060-106-111-041-150-067-072-163-093-044	IgKV3-20-01	CDR1 de VL	QSVX1SX2Y	en donde X1 = S o R y X2 = S o T
SEQ ID NO: 005-059-060-106-111-041-150-067-072-163-093-044	IgKV3-20-01	CDR2 de VL	GAS	

SEQ ID NO: 69 005-059-060-106-111-041-150-067-072-163-093-044	IgKV3-20-01	CDR3 de VL	QX1YGX2SX3X4 X5T	en donde X1 = Q o L; X2 = S o T; X3 = P o ninguno; X4 = P, L, R, o ninguno; y X5 = L, F, I, o ninguno; preferentemente, en donde X4 = P, L, o ninguno
SEQ ID NO: 13 006	IgKV3-11-01	CDR1 de VL	QSVSSY	
006	IgKV3-11-01	CDR2 de VL	DAS	
SEQ ID NO: 14 006	IgKV3-11-01	CDR3 de VL	QQRSNWPPLT	

Ejemplo 11 - Purificación de anticuerpos

El sobrenadante del cultivo se filtró sobre filtros sin salida de 0,2 µm, se cargó en columnas MabSelect SuRe de 5 ml (GE Health Care) y se eluyó con citrato de sodio-NaOH 0,1 M, pH 3. El eluido se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2M, pH 9 y se dializó durante la noche a NaH₂PO₄ 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B.Braun). Como alternativa, después de la purificación, el eluido se cargó en una columna de desalinización HiPrep y el anticuerpo se intercambió en tampón de NaH₂PO₄ 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B.Braun). Después de la diálisis o el intercambio de tampón, las muestras se filtraron de forma estéril en filtros sin salida de 0,2 µm. La pureza se determinó mediante SDS-PAGE y la concentración se midió mediante nefelometría y absorbancia a 280 nm. Los anticuerpos purificados se almacenaron a 4 °C. La espectrometría de masas se realizó para identificar la masa molecular de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo expresada por los hibridomas como se describe en el Ejemplo 9.

Ejemplo 12 - Unión de clones de HER2 a células tumorales que expresan HER2 unido a la membrana medido mediante análisis FACS

La unión de los anticuerpos HER2 a las células AU565 (adquiridas en ATCC, CRL-2351) y las células A431 (adquiridas en ATCC, CRL-1555) se probó mediante citometría de flujo (FACS Canto II, BD Biosciences). El análisis de Qifi (Dako, Glostrup, Dinamarca) reveló que las células AU565 expresaron en promedio 1.000.000 de copias de proteína HER2 por célula, mientras que las células A431 expresaron en promedio 15.000 copias por célula. La unión de los anticuerpos HER2 se detectó utilizando un anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson). Se utilizó Herceptin® (Roche) de grado clínico como control positivo, y se utilizó un anticuerpo de control de isotipo como control negativo. Los valores de CE₅₀ se determinaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism V4.03 (software GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos).

Como se muestra en la Figura 3, todos los anticuerpos HER2 probados se unieron a HER2 expresados en ambas células AU565 y A431 de una manera dependiente de la dosis. Los valores de CE₅₀ para la unión variaron entre 0,304-2,678 µg/ml para células AU565 y entre 0,106-1,982 µg/ml para células A431. Especialmente en las células A431, se observaron grandes diferencias en los valores de CE₅₀ entre los anticuerpos probados. También se observaron algunas diferencias en los niveles máximos de unión entre diferentes anticuerpos. En particular, los anticuerpos 005 y 006 demostraron niveles de unión máximos más altos en A431 en comparación con otros anticuerpos HER2.

Ejemplo 13 - Unión de anticuerpos HER2 a HER2 unido a la membrana expresado en células epiteliales de Rhesus medida mediante análisis FACS

Para determinar la reactividad cruzada con HER2 de Rhesus, la unión de los anticuerpos HER2 a las células epiteliales de Rhesus positivas para HER2 (4MBR-5; adquiridas en ATCC) se analizó mediante citometría de flujo (FACS Canto II, BD Biosciences). Se utilizó un anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina (Jackson) como un conjugado secundario. Un anticuerpo control de isotipo se usó como anticuerpo de control negativo.

Como se muestra en la Figura 4, todos los anticuerpos HER2 probados presentaron reactividad cruzada con HER2 de mono Rhesus. A ambas concentraciones probadas (1 µg/ml y 10 µg/ml), los anticuerpos HER2 fueron capaces de unirse específicamente a HER2 de mono Rhesus. No se observó unión con el anticuerpo de control de isotipo.

Ejemplo 14 - Competición de anticuerpos HER2 para unirse a Her2ECDHis soluble medido en ELISA tipo sandwich

Las concentraciones óptimas de recubrimiento de los anticuerpos HER2 probados y la concentración óptima de Her2ECDHis se determinaron de la siguiente manera: Los pocillos de ELISA se recubrieron durante la noche a 4 °C con HuMabs HER2 diluidos en serie en PBS (0,125-8 µg/ml en diluciones dobles). A continuación, los pocillos de ELISA se lavaron con PBST (PBS complementado con Tween-20 al 0,05 % [Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos]) y se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente (TA) con PBSTC (PBST complementado con suero de pollo al 2 % [v/v] [Gibco, Paisley, Escocia]). Los pocillos de ELISA se lavaron luego con PBST y se incubaron durante una hora a TA con Her2ECDHis diluido en serie en PBSTC (0,25-2 µg/ml en diluciones dobles). El Her2ECDHis no unido se lavó con PBST y el Her2ECDHis unido se incubó durante una hora a TA con 0,25 µg/ml de anti-6xhis-biot de conejo biotinilado (Abcam, Cambridge, Reino Unido). La placa se lavó posteriormente con PBST y se incubó durante una hora con 0,1 µg/ml de estreptavidina-poli-HRP (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) diluida en PBST. Después del lavado, la reacción se visualizó a través de una incubación de 15 minutos con 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS: un comprimido de ABTS diluido en 50 ml de tampón ABTS (Roche Diagnostics, Almere, Almere, Países Bajos)) a TA (temperatura ambiente) protegida de la luz. La colorización se detuvo mediante la adición de un volumen igual de ácido oxálico (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). La fluorescencia a 405 nm se midió en un lector de placas de microtitulación (Biotek Instruments, Winooski, EE.UU.). Las concentraciones de anticuerpos que dieron como resultado una unión subóptima de cada anticuerpo se

determinaron y utilizaron para los siguientes experimentos de bloqueo cruzado.

Cada anticuerpo HER2 se recubrió en los pocillos de ELISA a la dosis subóptima que se determinó como se describe anteriormente. Después del bloqueo de los pocillos de ELISA, los pocillos se incubaron con la concentración predeterminada de 1 µg/ml de Her2ECDHis biotinilado en presencia o ausencia de un exceso de un segundo anticuerpo HER2 (competidor). El ELISA se realizó como se describe anteriormente. La unión residual de Her2ECDHis al anticuerpo recubierto se expresó como un porcentaje relativo a la unión observada en ausencia de anticuerpo competidor. El porcentaje de competencia para cada combinación de anticuerpos se determinó como 100 menos el porcentaje de inhibición. El 75 % de competencia representó bloqueo completo, con el 25-74 % de competencia representando bloqueo parcial, y el 0-24 % de competencia sin bloqueo.

Como se muestra en la Tabla 5, todos los anticuerpos HER2 compitieron por unirse a Her2ECDHis, al menos parcialmente, con ellos mismos. Trastuzumab (Herceptin® de grado clínico) y pertuzumab (TH1014-pert, producido de forma transitoria en células HEK-293) solo podrían competir entre sí y no con ninguno de los otros anticuerpos HER2 enumerados. C1 y F5 (ambos producidos de forma transitoria en las células HEK-293) compitieron entre sí por la unión a Her2ECDHis, pero no compitieron con otros anticuerpos HER2.

Los anticuerpos 005, 006, 059, 060, 106 y 111 compitieron entre sí para unirse a Her2ECDHis, pero no se cruzaron con el trastuzumab, pertuzumab, C1 o F5. Los clones 005, 059, 060 y 106 solo bloquearon 006 cuando 006 era el anticuerpo competidor. En la reacción inversa donde se inmovilizó 006, no se encontró bloqueo con 005, 059, 060 o 106. Este fue posiblemente el resultado de la mayor afinidad aparente del clon 006 en comparación con 005, 059, 060, 106 y 111, que se muestra en las Figuras 3A y 3B. Los valores superiores al 100 % se pueden explicar por los efectos de avididad y la formación de complejos de anticuerpo-Her2ECDHis que contienen dos anticuerpos no bloqueantes.

Tabla 5: Competencia y bloqueo de anticuerpos HER2 para unirse a Her2ECDHis

mAb inmovilizado <i>i</i>	mAb de competencia: →									
	Tras	Pert	C1	F5	106	111	005	006	059	060
Trastuzumab	6	100	103	99	114	166	137	110	120	119
TH1014-pert	104	9	106	125	115	145	151	125	132	118
TH1014-C1	89	85	65	58	84	86	98	99	89	93
TH1014-F5	197	178	70	21	129	183	178	192	165	185
PC1014-106	323	275	471	495	26	21	25	25	25	23
PC1014-111	110	102	122	119	75	14	51	10	65	36
PC1014-005	126	115	157	227	54	32	18	15	22	12
PC1014-006	163	136	136	153	127	47	148	20	129	125
PC1014-059	117	107	78	128	23	12	13	11	12	11
PC1014-060	106	99	108	126	37	35	6	6	14	19
Grupo de bloqueo cruzado	1	2	3	3	4	4	4	4	4	4

75 - 100 % de competencia

25 - 74 % de competencia,

0 - 24 % de competencia

Los valores representados son porcentajes medios de inhibición de la unión en relación con la unión observada en ausencia de anticuerpo competidor, de dos experimentos independientes. Los experimentos de competencia con C1 y F5 producidos por HEK (TH1014-C1 y TH1014-F5) se realizaron una vez. Trastuzumab (Herceptin® de grado clínico) y pertuzumab producido por HEK (TH1014-pert) también se analizaron dos veces.

Ejemplo 15 - Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC)

Se recogieron células SK-BR-3 (adquiridas en ATCC, HTB-30) (5×10^6 células), se lavaron (dos veces en PBS, 1500 rpm, 5 min) y se recogieron en 1 ml de medio RPMI 1640 complementado con suero de ternera cósmica (CCS) al 10 % (HyClone, Logan, UT, EE.UU.), al que se agregaron 200 µCi ^{51}Cr (Chromium-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Rosendaal, Países Bajos). La mezcla se incubó en un baño de agua con agitación durante 1,5 horas a 37 °C. Después del lavado de las células (dos veces en PBS, 1500 rpm, 5 min), las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 complementado con CCS al 10 %, se contaron mediante exclusión de azul de tripano y se diluyeron a una concentración de 1×10^5 células/ml.

Mientras tanto, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, de sus siglas en inglés) a partir de capas leucocitarias frescas (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) utilizando una centrifugación de densidad estándar

de Ficoll de acuerdo con las instrucciones del fabricante (medio de separación de linfocitos; Lonza, Verviers, Francia). Después de la resuspensión de las células en medio RPMI 1640 complementado con CCS al 10 %, las células se contaron mediante exclusión con azul de tripano y se concentraron hasta 1×10^7 células/ml.

- 5 Para el experimento ADCC, se preincubaron 50 μ l de células SK-BR-3 marcadas con ^{51}Cr (5.000 células) con 15 μ g/ml de anticuerpo HER2 (IgG1, κ) en un volumen total de 100 μ l de medio RPMI complementado con CCS al 10 % en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después de 15 min a TA, se agregaron 50 μ l de PBMC (500.000 células), lo que dio como resultado una relación de efector a diana de 100:1. La cantidad máxima de lisis celular se determinó mediante la incubación de 50 μ l de células SK-BR-3 marcadas con ^{51}Cr (5.000 células) con 100 μ l de Triton-X100 al 5 %. La cantidad de lisis espontánea se determinó mediante la incubación de 5.000 células SK-BR-3 marcadas con ^{51}Cr en 150 μ l de medio, sin ningún anticuerpo o células efectoras. El nivel de lisis celular independiente de anticuerpo se determinó mediante la incubación de 5.000 células SK-BR-3 con 500.000 PBMC sin anticuerpo. Posteriormente, las células se incubaron 4 horas a 37 ° C, CO₂ al 5 %. Para determinar la cantidad de lisis celular, las células se centrifugaron (1200 rpm, 3 min) y se transfirieron 75 μ l de sobrenadante a tubos microcéntricos, después de lo cual se contó el ^{51}Cr liberado utilizando un contador gamma. Los recuentos medidos por minuto (cpm, de sus siglas en inglés) se utilizaron para calcular el porcentaje de lisis mediada por anticuerpos de la siguiente manera:

$$(cpm \text{ de muestra} - cpm \text{ de lisis independiente de Ab}) / (cpm \text{ de lisis máxima} - cpm \text{ de lisis espontánea}) \times 100 \%$$

- 20 Como se muestra en la Figura 5, todos los anticuerpos HER2 indujeron una lisis eficaz de las células SK-BR-3 a través de ADCC. El porcentaje promedio de lisis por los diferentes anticuerpos varió entre el 15 % y el 28 %, a excepción del trastuzumab (Herceptin®), que mostró un promedio de lisis del 41 %. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, el mayor porcentaje de lisis mediante trastuzumab posiblemente se debió a un mayor grado de fucosilación no central (12,4 %) debido a su producción de CHO, en comparación con aproximadamente el 4 % de fucosilación no central en los otros anticuerpos HER2 producidos por HEK, o mediante el reconocimiento de un epítipo que induce una menor internalización de los complejos receptor-anticuerpo HER2.

30 Ejemplo 16 - Inhibición de la proliferación independiente de ligando de células AU565

- Los anticuerpos HER2 se probaron para determinar su capacidad para inhibir la proliferación de células AU565 *in vitro*. Debido a los altos niveles de expresión de HER2 en las células AU565 (~ 1.000.000 de copias por célula como se describe en el Ejemplo 12), HER2 es constitutivamente activo en estas células y, por lo tanto, no depende de la heterodimerización inducida por el ligando.

- 35 En una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania) se sembraron 9.000 células AU565 por pocillo en presencia de 10 μ g/ml de anticuerpo HER2 en medio de cultivo celular sin suero. Como control, las células se sembraron en medio sin suero sin anticuerpo. Después de 3 días, la cantidad de células viables se cuantificó con Alamarblue (BioSource International, San Francisco, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se monitorizó utilizando el lector EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlandia) con la configuración estándar de Alamarblue. La señal de Alamarblue de las células tratadas con anticuerpos se representó como un porcentaje en relación con las células no tratadas. La prueba de Dunnett se aplicó para el análisis estadístico.

- 45 Los resultados se muestran en la Figura 6, que muestra el porcentaje de proliferación de células AU565 después del tratamiento con anticuerpo HER2 en comparación con células no tratadas, que se estableció en 100 %. Herceptin aparentemente inhibió la proliferación de células AU565, pero este efecto no fue estadísticamente significativo. TH1014-F5 aumentó significativamente la proliferación de células AU565, lo que indica que se trata de un anticuerpo agonista, mientras que ninguno de los otros anticuerpos analizados (005, 060 y pertuzumab) tuvo un efecto sustancial sobre la proliferación de AU565. Para trastuzumab (Herceptin®) y pertuzumab, esto estuvo de acuerdo con los resultados descritos por Juntilla et al. (Cancer Cell 2009; 15 (5):353-355).

Tabla 6: Porcentaje promedio de proliferación de células AU565 después del tratamiento con anticuerpo HER2 en comparación con células no tratadas, que se estableció en 100 %.

anticuerpo	% de proliferación
PC1014-005	103
PC1014-060	104
TH1014-F5	180
TH1014-pert	101
Herceptin	83
control de isotipo	101

55

Ejemplo 17 - Ensayo anti-kappa-ETA'

Para investigar la idoneidad de los anticuerpos HER2 para un abordaje del conjugado anticuerpo-fármaco, se desarrolló un ensayo genérico de destrucción *in vitro* basado en células utilizando pseudomonas-exotoxina A dirigida por kappa (anti-kappa-ETA'). El ensayo hace uso de un anticuerpo anti-dominio kappa de alta afinidad conjugado con una forma truncada de la pseudomonas-exotoxina A. Tras la internalización, el anticuerpo anti-dominio kappa-ETA' experimenta una proteólisis y una reducción del enlace disulfuro, separando el catalizador del dominio de unión. El dominio catalítico se transporta desde el Golgi al retículo endoplásmico a través del motivo de retención KDEL y, posteriormente, se transloca al citosol donde inhibe la síntesis de proteínas e induce la apoptosis (Kreitman RJ, BioDrugs 2009; 23 (1): 1-13). En este ensayo, para identificar los anticuerpos HER2 que permiten la internalización y la destrucción a través de la toxina, los anticuerpos HER2 se preconjugan con el anti-kappa-ETA' antes de la incubación con células positivas para HER2. Como se ha señalado anteriormente, las células AU565 expresan un alto número de moléculas de Her2 por célula (~ 10⁶ moléculas/célula), mientras que las células A431 expresan un bajo número de moléculas de Her2 por célula (~ 30.000 moléculas/célula).

En primer lugar, se determinó la concentración óptima de anti-kappa-ETA' para cada línea celular, es decir, la dosis máxima tolerada que no conduce a la inducción de destrucción celular no específica. Se sembraron células AU565 (7500 células/pocillo) y células A431 (2500 células/pocillo) en medio de cultivo celular normal en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Greiner bio-one) y se dejaron adherir durante al menos 4 horas. A continuación, las células se incubaron con 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 y 0 µg/ml de diluciones de anti-kappa-ETA' en medio de cultivo de células normales. Después de 3 días, la cantidad de células viables se cuantificó con Alamarblue (BioSource International, San Francisco, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se monitorizó utilizando el lector EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlandia) con la configuración estándar de Alamarblue. La concentración más alta de anti-kappa-ETA' que no destruyó las células por sí misma se utilizó para los siguientes experimentos (0,5 µg/ml para AU565 y 1 µg/ml para A431).

A continuación, se analizó la internalización y destrucción mediada por anticuerpos mediante la toxina para detectar diferentes anticuerpos HER2. Las células se sembraron como se describe anteriormente. Las series de dilución de anticuerpos HER2 se incubaron previamente durante 30 minutos con la concentración predeterminada de anti-kappa-ETA' antes de agregarlos a las células. Después de 3 días de incubación, la cantidad de células viables se cuantificó como se describe anteriormente. La señal de Alamarblue de las células tratadas con anticuerpos conjugados con anti-kappa-ETA' se representó en comparación con las células tratadas con el anticuerpo solo. Se utilizaron 23,4 µg/ml de estaurosporina como control positivo para la destrucción celular. Un anticuerpo control de isotipo se usó como control negativo.

Como se muestra en la Figura 7A y en la Tabla 7, todos los anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA' fueron capaces de destruir las células AU565 de una manera dependiente de la dosis. Herceptin conjugado con anti-kappa-ETA' destruyó solo el 32 % de las células AU565, mientras que todos los demás anticuerpos conjugados indujeron el 50-72 % de la destrucción celular. Por otra parte, los anticuerpos 005 y 111 demostraron más de tres veces mejores valores de CE₅₀ (respectivamente, 15,13 y 24,20 ng/ml) en comparación con trastuzumab (78,49 ng/ml). Excepto por el trastuzumab, los anticuerpos HER2 no conjugados no indujeron la destrucción de células AU565 en las concentraciones probadas.

Tabla 7: Destrucción de células AU565 mediante anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA'. Los datos que se muestran son los valores de CE₅₀ y el porcentaje máximo de destrucción celular de las células AU565 tratadas con anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA', medidos en un experimento representativo. La destrucción celular inducida por estaurosporina se estableció como 100 % y la MFI de las células no tratadas se estableció como 0 %. "Ndet" significa no detectado.

anticuerpo	% de destrucción celular	CE50 ng/ml
PC1014-111	72,0	24,2
PC1014-005	69,7	15,13
PC1014-059	67,0	67,65
PC1014-060	64,3	79,38
PC1014-106	59,1	107,9
PC1014-006	50,4	45,14
Trastuzumab	31,9	78,49
control de isotipo	Ndet	Ndet

Como se muestra en la Figura 7B y en la Tabla 8, los anticuerpos 005 y 060 fueron capaces de inducir la destrucción eficaz de células A431 (≥ 85 %) cuando se conjugaron con anti-kappa-ETA', mientras que Herceptin conjugado anti-kappa-ETA' y el control de isotipo no indujeron la destrucción de células A431. Por otra parte, los anticuerpos 005 y 111 demostraron la destrucción de células A431 ya a bajas concentraciones de anticuerpos (10 ng/ml) con valores de CE₅₀ de ~ 10 ng/ml. No se observó destrucción celular con anticuerpos HER2 no conjugados.

Tabla 8: Destrucción de células A431 mediante anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA'. Los datos que se muestran son los valores de CE_{50} y el porcentaje máximo de destrucción celular de las células A431 tratadas con anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA', medidos en un experimento representativo. La destrucción celular inducida por estaurosporina se estableció como 100 % y la MFI de las células no tratadas se estableció como 0 %.

anticuerpo	% de destrucción celular	CE50 ng/ml
PC1014-005	88,5	~ 10,07
PC1014-060	85,0	~ 10,03
Trastuzumab	Ndet	Ndet
control de isotipo	Ndet	Ndet

Ejemplo 18 - Internalización de anticuerpos HER2 medidos con un ensayo fab-CypHer5E basado en FMAT

Para investigar si la destrucción mejorada de células AU565 observadas en el ensayo kappa-toxina-ETA' descrito en el Ejemplo anterior correlacionado con la internalización mejorada de los anticuerpos HER2, se realizó un ensayo de internalización basado en fab-CypHer5E. CypHer5E es un colorante sensible al pH que no es fluorescente a pH básico (extracelular: medio de cultivo) y fluorescente a pH ácido (intracelular: lisosomas), con una constante de disociación ácida (pK_a) de 7,3.

Se sembraron células AU565 en placas de cultivo de tejidos de 384 pocillos (Greiner bio-one), a una densidad de 3000 células/pocillo en medio de cultivo celular normal complementado con 240 ng/ml de fab-CypHer5E (conjugación en casa de anticuerpo de cabra fab anti-IgG humana [Jackson] con CypHer5E [GE Healthcare, Eindhoven, Países Bajos] de acuerdo con las instrucciones del fabricante). A continuación, los anticuerpos HER2 se diluyeron en serie en un medio de cultivo celular normal, se agregaron a las células y se dejaron a temperatura ambiente durante 9 horas. Las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de CypHer5E intracelular se midieron utilizando el 8200 FMAT (Applied Biosystems, Nieuwerkerk A/D IJssel, Países Bajos) y se utilizaron los recuentos x fluorescencia como lectura. Un anticuerpo control de isotipo se usó como anticuerpo de control negativo. Los valores de CE_{50} y MFI máxima se determinaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoideal con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism V4.03 (software GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos).

Los resultados se muestran en la Tabla 9, que representan los valores de CE_{50} y la MFI máxima para todos los anticuerpos HER2 probados en el ensayo de internalización CypHer5E con células AU565. Los valores máximos de MFI reflejan cuántos anticuerpos HER2 se internalizaron tras la unión. Todos los anticuerpos HER2 humanos mostraron valores de MFI máximos más altos (130,529-57,428) que trastuzumab (35,000) y TH1014-pert (35,323), lo que indica que estos anticuerpos indujeron una mayor internalización del receptor. La internalización mejorada de TH1014-F5 puede ser el resultado de su actividad agonística y la inducción de la dimerización de HER2-HER2 (véase el Ejemplo 16).

Tabla 9: Ensayo de internalización basado en Cypher-5 de anticuerpos HER2. Los datos mostrados son valores de MFI y CE_{50} de un experimento representativo de dos experimentos con células AU565 tratadas con anticuerpos HER2 marcados con Fab-CypHer5E.

Cypher 5		
Anticuerpo	CE_{50} ng/ml	MFI máxima
PC1014-006	23,08	130829
PC1014-005	21,37	95117
PC1014-111	35,22	81680
PC1014-059	14,77	77123
PC1014-060	36,16	68184
PC1014-106	68,60	57428
TH1014-F5	22,65	113116
TH1014-pert	~ 1041	35323
Trastuzumab	21,70	35000

Ejemplo 19 - Modulación por disminución de HER2

Para investigar si la internalización de HER2 mejorada inducida por los anticuerpos de la presente invención también da como resultado una modulación por disminución mejorada del receptor, se seleccionó 005 como anticuerpo representativo y se probó su capacidad para inducir la modulación por disminución de HER2. Para este fin, las células AU565 se incubaron 3 días con anticuerpos HER2 y se analizaron para detectar la presencia de HER2. Se sembraron células AU565 en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos (100.000 células/pocillo) en medio de cultivo celular normal y se cultivaron durante 3 días a 37 °C en presencia de 10 µg/ml de anticuerpo HER2. Después de

lavar con PBS, las células se lisaron mediante incubación durante 30 min a temperatura ambiente con 25 µl de tampón de lisis Surefire (Perkin Elmer, Turku, Finlandia). Se cuantificaron los niveles totales de proteínas utilizando el reactivo de ensayo de proteínas del ácido bicinonínico (BCA) (Pierce) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles de proteína HER2 en los lisados se analizaron utilizando un ELISA tipo sándwich específico de HER2. El anticuerpo de conejo anti-dominio intracelular de HER2 humano (señalización celular) se utilizó para capturar HER2 y el anticuerpo policlonal de cabra anti-HER2 humano biotinilado (R&D), seguido de estreptavidina-poli-HRP, se usó para detectar HER2 unido. La reacción se visualizó utilizando ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS: diluir un comprimido de ABTS en 50 ml de tampón ABTS [Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos]) y se detuvo con ácido oxálico (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). La fluorescencia a 405 nm se midió en un lector de placas de microtitulación (Biotek Instruments, Winooski, EE.UU.) y la cantidad de HER2 se expresó como un porcentaje con respecto a las células no tratadas.

Los resultados se muestran en la Figura 8 y en la Tabla 10 a continuación, que representan la cantidad de HER2 expresada como un porcentaje en comparación con las células no tratadas. Los resultados en la Figura 8 y la Tabla 10 demuestran que el anticuerpo 005 indujo aproximadamente el 30 % de la modulación por disminución de HER2, mientras que Herceptin indujo aproximadamente el 20 % de la modulación por disminución de HER2. Esto estaba en línea con la internalización mejorada observada por el anticuerpo 005.

Tabla 10: Modulación por disminución de HER2 inducida por el anticuerpo representada como porcentaje de HER2 en comparación con las células no tratadas

anticuerpo	% de HER2 en comparación con las células no tratadas
Herceptin	80
IgG1-1014-005	70
control de isotipo	108

Ejemplo 20 - Colocalización de anticuerpos HER2 con marcador lisosomal LAMP1 analizado mediante microscopía confocal.

El ensayo de modulación por disminución de HER2 como se describe en el ejemplo 19 y el ensayo de internalización basado en CypHer-5E indicaron que los anticuerpos HER2 de la presente invención se internalizaron más eficazmente y se dirigieron a los lisosomas. Para confirmar estos hallazgos, se aplicó tecnología de microscopía confocal. Las células AU565 se cultivaron en cubreobjetos de vidrio (espesor 1,5 micras, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Alemania) en medio de cultivo de tejidos estándar a 37 °C durante 3 días. Las células se incubaron previamente durante 1 hora con 50 µg/ml de leupeptina (Sigma) para bloquear la actividad lisosomal, después de lo cual se agregaron 10 µg/ml de anticuerpo HER2. Las células se incubaron durante 3 o 18 horas adicionales a 37 °C. A continuación, se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 min. a TA (temperatura ambiente) con formaldehído al 4 % (Klinipath). Los portaobjetos se lavaron con tampón de bloqueo (PBS complementado con saponina al 0,1 % [Roche] y BSA al 2 % [Roche]) y se incubaron durante 20 minutos con tampón de bloqueo que contenía NH₄Cl 20 mM para inactivar el formaldehído. Los portaobjetos se lavaron de nuevo con tampón de bloqueo y se incubaron durante 45 min a TA con anti-CD107a humano de ratón (LAMP1) (BD Pharmingen) para identificar lisosomas. Después del lavado con tampón de bloqueo, los portaobjetos se incubaron 30 min a TA con un cóctel de anticuerpos secundarios; anti-IgG-Cy5 de ratón de cabra (Jackson) y anti-IgG-FITC humano de cabra (Jackson). Los portaobjetos se lavaron de nuevo con tampón de bloqueo y se montaron en portaobjetos de microscopio utilizando 20 µl de medio de montaje (6 gramos de Glicerol [Sigma] y 2,4 gramos de Mowiol 4-88 [Omnilabo] se disolvieron en 6 ml de agua destilada a la que se añadió 12 ml de Tris 0,2 M [Sigma] pH 8,5 seguido de incubación durante 10 minutos a 50-60 °C. El medio de montaje se dividió en partes alícuotas y se almacenó a -20 °C). Se tomaron imágenes de los portaobjetos con un microscopio confocal Leica SPE-II (Leica Microsystems) equipado con una lente objetivo de inmersión en aceite 63x 1,32-0,6 y el software LAS-AF. Para permitir la cuantificación de intensidades de píxeles superpuestas, la intensidad del láser, la ganancia y el desplazamiento se ajustaron para visualizar los anticuerpos sin saturación de píxeles. Esta configuración se mantuvo igual para todos los portaobjetos focales.

Las imágenes TIFF en escala de grises de 12 bits se analizaron para la colocalización utilizando el software MetaMorph® (versión Meta Series 6.1, Molecular Devices Inc, Sunnyvale California, EE.UU.). Las imágenes FITC y Cy5 se importaron como pilas y se restó el fondo. Se utilizaron ajustes de umbrales idénticos (establecidos manualmente) para todas las imágenes FITC y todas las imágenes Cy5. La colocalización se describió como la intensidad de píxel de FITC en la región de superposición (ROI), donde la ROI se compone de todas las regiones positivas a Cy5. Para comparar diferentes portaobjetos teñidos con varios anticuerpos HER2, las imágenes se normalizaron utilizando la intensidad de píxeles de Cy5. Se usó anticuerpo de cabra anti-IgG-Cy5 de ratón para teñir el marcador lisosomal LAMP1 (CD107a). La intensidad de píxeles de LAMP1 no debe diferir entre los distintos anticuerpos HER2 probados.

Valores normalizados para la colocalización de FITC y Cy5 =

$$\frac{(\text{Total de intensidad de píxeles FITC} \times \text{porcentaje de colocalización FITC-Cy5} / 100)}{\text{Total de Intensidad de píxeles Cy5}}$$

Los resultados se muestran en la Figura 9 y en la Tabla 11 a continuación, y representan la superposición de la intensidad de píxeles de FITC con Cy5 para varios anticuerpos HER2. Para cada anticuerpo, se analizaron tres imágenes diferentes de un portaobjetos que contiene ~ 1, 3 o > 5 células. Se observó una variación significativa entre las diferentes imágenes dentro de cada portaobjetos. Aun así, fue evidente que el anticuerpo 005 demostró un aumento de la colocalización con el marcador lisosomal LAMP1, en comparación con Herceptin y pertuzumab. Estos resultados indican que una vez internalizado, el anticuerpo HER2 005 se clasifica de manera eficaz hacia los compartimentos lisosómicos, lo que lo hace especialmente interesante para un enfoque de conjugado de fármaco y anticuerpo.

Tabla 11: Las intensidades de píxel FITC medias se superponen con Cy5 representado como unidades arbitrarias

anticuerpo	intensidad de píxel FITC en lisosomas [unidades arbitrarias]
TH1014-005	0,619
TH1014-pert	0,214
Herceptin	0,236

Ejemplo 21 - El dominio extracelular de HER2 se selecciona de forma aleatoria de humano a pollo

Para definir mejor las regiones de unión a HER2 reconocidas por los anticuerpos de la presente invención, se realizó un experimento de orden aleatorio de dominio extracelular de HER2. Para este fin, se generó una pequeña biblioteca de síntesis génica con cinco construcciones, intercambiando las secuencias del dominio I, II, III o IV del dominio extracelular del HER2 humano por la secuencia correspondiente del HER2 de pollo (Isoforma de Gallus gallus B NCBI: NP_001038126.1): 1) HER2 completamente humano (Uniprot P04626) en adelante denominado hu-HER2, 2) hu-HER2 con dominio I de pollo (que reemplaza los aminoácidos (aa) 1-203 del Her2 humano con la correspondiente región Her2 de pollo) en adelante denominada hu-HER2-ch(I), 3) hu-HER2 con dominio II de pollo (que reemplaza los aminoácidos (aa) 204-330 del Her2 humano con la correspondiente región Her2 de pollo) en adelante denominada hu-HER2-ch(II), 4) hu-HER2 con el dominio III de pollo (que reemplaza los aa 331-507 del Her2 humano con la correspondiente región Her2 de pollo) en adelante denominada hu-HER2-ch(III) y 5) hu-HER2 con el dominio IV de pollo (que reemplaza los aa 508-651 del Her2 humano con la correspondiente región Her2 de pollo) en adelante denominada hu-HER2-ch(IV). Los ortólogos de HER2 humanos y de pollo muestran una homología del 67 % en su dominio extracelular con una homología del 62 % en el dominio I, una homología del 72 % en el dominio II, una homología del 63 % en el dominio III y una homología del 68 % en el dominio IV. Las construcciones se transfectaron de forma transitoria en la línea celular Freestyle™ CHO-S (Invitrogen) utilizando el reactivo de transfección Freestyle MAX (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y las células transfectadas se cultivaron durante 20 horas. La unión del anticuerpo HER2 a las células transfectadas se analizó mediante citometría de flujo:

las células CHO-S transfectadas se recogieron, se lavaron con tampón FACS y se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpo HER2 (30 minutos en hielo). La unión de los anticuerpos HER2 se detectó utilizando un anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson). Para verificar si la expresión entre diferentes lotes fue la misma, las células se fijaron y se permeabilizaron utilizando solución Cytofix/Cytoperm (BD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se tiñeron con un anticuerpo anti-HER2 humano intracelular de conejo (DAKO) en combinación con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con PE (Jackson). Un anticuerpo control de isotipo se usó como control negativo. La fluorescencia se midió en un FACSCanto-II (BD) y las curvas de unión se realizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism V4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). La pérdida de unión se usó como lectura para identificar qué dominios HER2 fueron reconocidos por los diferentes anticuerpos.

Las curvas de unión ejemplares para el anticuerpo 106 se muestran en la figura 10. Todos los resultados de unión se muestran en la Tabla 12. Herceptin mostró una pérdida de unión a Hu-HER2-ch(IV), pero no a las proteínas con uno de los dominios restantes seleccionados de forma aleatoria, lo que confirma que los epítomos de Herceptin residen en el dominio IV de HER2. El Pertuzumab mostró solo una pérdida de unión a Hu-HER2-ch(II), lo que confirma que su epítopo reside en el dominio II de HER2. Los anticuerpos 005, 006, 060 y 111 mostraron pérdida de unión tras la sustitución del dominio III de HER2, lo que demostró que el epítopo reside en el dominio III de HER2. De forma interesante, los anticuerpos 059 y 106 demostraron una pérdida de unión tanto a hu-HER2-ch(III) como a hu-HER2-ch(I), lo que implica que los anticuerpos 059 y 106 reconocen un epítopo conformacional dentro de estos dos dominios.

Tabla 12: Resumen de la unión del anticuerpo HER2 a diferentes construcciones de receptores HER2ECD. FL; hu-HER2, I; hu-HER2-ch(I), II; hu-HER2-ch(II), III; hu-HER2-ch(III), IV; hu-HER2-ch(IV). +++ indica unión normal, + indica una unión reducida en comparación con la unión observada en hu-HER2, - indica que no se ha detectado ninguna unión.

5

Anticuerpo	Dominio HER2 seleccionado de forma aleatoria				
	FL	I	II	III	IV
Herceptin	+++	+++	+++	+++	-
Pertuzumab	+++	+++	+	+++	+++
005	+++	+++	+++	-	+++
006	+++	+++	+++	-	+++
059	+++	-	+++	-	+++
060	+++	+++	+++	-	+++
106	+++	-	+++	-	+++
111	+++	+++	+++	-	+++

Ejemplo 22 - Eficacia *in vivo* del HuMab HER2 005 en xenoinjertos de carcinoma gástrico humano NCI-N87 en ratones SCID

10 Se determinó el efecto *in vivo* del HuMab HER2 005 sobre el crecimiento y la supervivencia del tumor en un modelo de xenoinjerto de carcinoma gástrico humano NCI-N87 en ratones CB.17 hembra con inmunodeficiencia combinada grave (SCID). Se inyectaron s.c. 10×10^6 células tumorales NCI-N87 en matrigel al 50 % en ratones SCID hembra, 10 ratones por grupo. Ocho días después de la inoculación del tumor, se inició el tratamiento intravenoso con los HuMabs HER2 005 o el anticuerpo de control HuMab-HepC. En la figura 11, esto se indica como día 1, día de inicio del tratamiento. La primera dosis fue de 40 mg/kg, seguida de 10 mg/kg en los días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25 después del inicio del tratamiento.

15 El volumen del tumor se determinó al menos 2 veces por semana. Los volúmenes (mm^3) se calcularon a partir de las medidas de calibre (PLEXX) como $(\text{ancho}^2 \times \text{largo})/2$. Los tumores se calibraron dos veces a la semana y cada animal se sacrificó cuando su tumor alcanzó el punto final predeterminado (800 mm^3).

20 Como se muestra en la Figura 11A y 11B, los ratones administrados con el HuMab 005 demostraron un crecimiento tumoral más lento (A) y una mejor supervivencia (B), respectivamente que los ratones que recibieron el anticuerpo de control negativo HuMab-HepC.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genmab A/S

30

<120> Anticuerpos monoclonales contra epítipo HER2

<130> P/63.WO

35

<160> 69

<170> PatentIn versión 3.5

40

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 718 821 T3

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe His Phe Tyr
 20 25 30

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

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Arg Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

<210> 2
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

10 Gly Tyr Ser Phe His Phe Tyr Trp
 1 5

<210> 3
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

20 Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
 1 5

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

Ala Arg Gln Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

30 <210> 5

ES 2 718 821 T3

<211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 5

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
 85 90 95

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

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 6

15

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 7

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr
 1 5

25

<210> 8
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 8

ES 2 718 821 T3

Glu Val Gln Leu Leu 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 Asn Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Lys Ala Arg Ile Trp Gly Pro Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
 1 5

10

<210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 10

Ile Arg Gly Gly Ala Gly Ser Thr
 1 5

20

<210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 11

Ala Lys Ala Arg Ile Trp Gly Pro Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 12

ES 2 718 821 T3

<211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 12

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

10 <210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 13

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5

20 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

25 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr
 1 5 10

30 <210> 15
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

ES 2 718 821 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Leu Leu Trp Phe Glu Glu Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

5 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

10 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Gly
 1 5

15 <210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

20 Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Lys Thr
 1 5

25 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

30 Ala Arg Ser Pro Leu Leu Trp Phe Glu Glu Leu Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 108

ES 2 718 821 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

5

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
 20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 20

Gln Ser Val Ser Ser Thr Tyr
 1 5

15

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 21

Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Leu Phe Thr
 1 5

25

<210> 22
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 22

ES 2 718 821 T3

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

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

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ala Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Ala Gly Asp Phe Tyr Tyr Phe Asp Gly Leu Asp Val Trp
 100 105 110

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

5 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

10 Gly Tyr Arg Phe Thr Thr Ser Tyr Trp
 1 5

15 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

20 Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr
 1 5

25 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

30 Ala Arg His Ala Gly Asp Phe Tyr Tyr Phe Asp Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15

<210> 26

ES 2 718 821 T3

<211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 26

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

10 <210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 27

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

20 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

25 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

30 <210> 29
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

ES 2 718 821 T3

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

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Thr Gly Asp Arg Gly Phe Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp
 100 105 110

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

<210> 30
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 30

Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Trp
 1 5

10

<210> 31
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
 1 5

20

<210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*

<400> 32

Ala Arg Leu Thr Gly Asp Arg Gly Phe Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp
 1 5 10 15

ES 2 718 821 T3

Val

5 <210> 33
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 33

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

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

10 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

15 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 34

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

20 <210> 35
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 35

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe Thr
 1 5

30 <210> 36
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 36

ES 2 718 821 T3

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

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 37
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 37

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

10

<210> 38
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala
 1 5

20

<210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*

<400> 39

Ala Arg Asp Gln Glu Tyr Ser Ser Asn Trp Tyr Tyr
 1 5 10

ES 2 718 821 T3

<210> 40
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 40

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

10 <210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 41

Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr
 1 5

20 <210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 42

Gln Leu Tyr Gly Ser Ser Pro Thr
 1 5

30 <210> 43
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 43

ES 2 718 821 T3

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

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

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

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Ser His Thr Arg Tyr Arg Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Ala Ile Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 44

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

10

ES 2 718 821 T3

35

40

45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
85 90 95

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

<210> 45
<211> 122
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 45

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

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

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

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Ser His Thr Arg Tyr Arg Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

10

<210> 46
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 46

ES 2 718 821 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
 85 90 95

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

5 <210> 47
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 47

ES 2 718 821 T3

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

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Lys Gly Asp Tyr Tyr Tyr His Tyr Gly Leu Asp Val Trp
 100 105 110

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

<210> 48
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 48

ES 2 718 821 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 49
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 49

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

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

10

ES 2 718 821 T3

85

90

95

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

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

<210> 50
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 50

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

10

<210> 51
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 51

ES 2 718 821 T3

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Ile Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

<210> 52
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 52

ES 2 718 821 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
 85 90 95

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

<210> 53
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

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

5

10

ES 2 718 821 T3

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

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Arg Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

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

<210> 54
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 54

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
85 90 95

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

10

<210> 55

ES 2 718 821 T3

<211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 55

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

10 <210> 56
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 56

ES 2 718 821 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
 85 90 95

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

<210> 57
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es Ser o Arg

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Ser, Thr, His o Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Ser, Arg o Phe

<400> 57

25 Gly Tyr Xaa Phe Xaa Xaa Tyr Trp
 1 5

<210> 58
 <211> 8
 30 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)

<223> Xaa es Asp, Tyr o His

<400> 58

Ile Xaa Pro Gly Asp Ser Xaa Thr
1 5

5

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

15 <223> Xaa es Gln, His o Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

20 <223> Xaa es Arg, Ala, Thr o Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

25 <223> Xaa es Gly

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

30 <223> Xaa es Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

35 <223> Xaa es Arg o ninguno

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

40 <223> Xaa es Gly o ninguno

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

45 <223> Xaa es Tyr o Phe

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

50 <223> Xaa es Tyr o Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

55 <223> Xaa es Tyr, Phe o His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

60 <223> Xaa es Tyr, Asp, Ser, Phe o Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

65 <223> Xaa es Met o Leu

ES 2 718 821 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa es Val o lle
 5
 <400> 59
 Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Gly Xaa Asp
 1 5 10 15
 Xaa
 10 <210> 60
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Asn o Ser
 20 <400> 60
 Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr Ala
 1 5
 25 <210> 61
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es Arg o Ser
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es Gly o Ser
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Ala o Gly
 <400> 61
 45 Ile Xaa Gly Xaa Xaa Gly Ser Thr
 1 5
 50 <210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es Leu o Tyr
 <400> 62

ES 2 718 821 T3

Ala Lys Arg Ile Trp Gly Pro Xaa Phe Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 63
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Arg o Ser

<400> 63

Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr Gly
 1 5

15 <210> 64
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Lys o Asn

<400> 64

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Xaa Thr
 1 5

30 <210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 65

Ala Arg Ser Pro Leu Leu Trp Phe Glu Glu Leu Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

40 <210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es Gly o Ala

50 <400> 66

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Xaa
 1 5

55 <210> 67
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE

ES 2 718 821 T3

<222> (9)..(9)
 <223> Xaa es Asn o Tyr

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Trp o Phe

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es Tyr o Asp

15 <400> 67

Ala	Arg	Asp	Gln	Glu	Tyr	Ser	Ser	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10	

<210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es Ser o Arg

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Ser o Thr

30 <400> 68

Gln	Ser	Val	Xaa	Ser	Xaa	Tyr
1				5		

<210> 69
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es Gln o Leu

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Ser o Thr

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Pro o ninguno

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es Pro, Leu, Arg o ninguno

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)

ES 2 718 821 T3

<223> Xaa es Leu, Phe, Ile o ninguno

<400> 69

5	Gln	Xaa	Tyr	Gly	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Thr
	1			5						10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), que comprende una región VH y una región VL seleccionadas de los grupos que consisten en:

- 5 a) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 2, 3 y 4, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 6, GAS, y SEQ ID NO: 7, respectivamente (005);
- 10 b) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 9, 10 y 11, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 13, DAS, y SEQ ID NO: 14, respectivamente (006);
- c) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 20, GAS, y SEQ ID NO: 21, respectivamente (059);
- 15 d) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 27, GAS, y SEQ ID NO: 28, respectivamente (060);
- e) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 30, 31 y 32, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 34, GAS, y SEQ ID NO: 35, respectivamente (106); y
- 20 f) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 41, GAS, y SEQ ID NO: 42, respectivamente (**111**).

25 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una región VH y una región VL seleccionadas del grupo que consiste en:

- a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**);
- 30 b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 (**006**);
- c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (059);
- 35 d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (060);
- e) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 (106);
- f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 (111); y
- 40 g) una variante de cualquiera de a), d) o e), en donde dicha variante tiene como máximo 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, y en donde el nuevo aminoácido es uno en la misma posición en una secuencia VH alineada en la Figura 1A o una secuencia VL alineada en la Figura 2A.

45 3. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene un valor de CE_{50} para la unión a células A431 inferior a 0,80 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente inferior a 0,50 $\mu\text{g/ml}$, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 12, y bloquea la unión a HER2 soluble de un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL seleccionadas del grupo que consiste en

- 50 a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**);
- b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 (**006**); y
- c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (**059**).
- 55

4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une específicamente a células epiteliales de Rhesus positivas para HER2, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 13, y bloquea la unión a HER2 soluble de un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL seleccionadas del grupo que consiste en

- 60 a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (**005**);
- b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 (**006**);
- 65 c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (**059**);

- d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 **(060)**;
- e) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 **(106)**; y
- 5 f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 **(111)**.
5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo, cuando se conjuga con una fracción terapéutica, tal como una forma truncada de la pseudomonas-exotoxina A, destruye al menos el 60 %, preferentemente al menos el 70 % de una línea celular de tumor que expresa HER2 cuando se determina como se describe en el Ejemplo 17, y bloquea la unión a HER2 soluble de un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de los grupos que consisten en:
- 10 a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 **(005)**
- 15 b) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 **(060)**
- c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 **(059)**, y
- 20 d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 **(111)**.
6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde una cantidad mayor del anticuerpo que el trastuzumab se internaliza por una línea celular de tumor que expresa HER2 cuando se determina de acuerdo con el Ejemplo 18, y en donde el anticuerpo bloquea de forma cruzada un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL seleccionadas del grupo que consiste en:
- 25 a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 **(005)**;
- 30 b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 **(006)**;
- c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 **(059)**;
- 35 d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 **(060)**;
- e) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 **(106)**; y
- 40 f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40 **(111)**.
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo bivalente.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno, o es un anticuerpo de longitud completa, preferentemente, un anticuerpo IgG1, en particular, un anticuerpo IgG1, κ .
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo deficiente en la función efectora, por ejemplo, un anticuerpo IgG4 humano estabilizado, tal como un anticuerpo en donde la arginina en la posición 409 en la región constante de la cadena pesada de la IgG4 humana está sustituida con lisina, treonina, metionina o leucina, preferentemente lisina y/o en donde la región bisagra comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys.
- 50 10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monovalente.
- 55 11. El anticuerpo de la reivindicación 10, en donde el anticuerpo monovalente comprende además una región C_H de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma que comprende las regiones C_H2 y C_H3, en donde la región C_H o fragmento de la misma se ha modificado de tal manera que la región correspondiente a la región bisagra y, si la inmunoglobulina no es un subtipo IgG4, otras regiones de la región C_H, como la región C_H3, no comprenden ningún resto de aminoácido, que sea capaz de formar enlaces disulfuro con una región C_H idéntica u otros enlaces de cadena inter-pesada no covalente covalentes o estables con una región C_H idéntica en presencia de IgG policlonal humana.
- 60 12. El anticuerpo de la reivindicación 11, en donde la inmunoglobulina mencionada en la etapa ii) es del subtipo gG4.
- 65

13. El anticuerpo de la reivindicación 12, en donde la cadena pesada se ha modificado de manera que se ha eliminado toda la región bisagra.
- 5 14. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, que comprende una primera región de unión a antígeno de un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y una segunda región de unión a antígeno que tiene una especificidad de unión diferente, tal como una especificidad de unión para una célula efectora humana, un receptor Fc humano, un receptor de linfocitos B o un epítipo no bloqueante de HER2.
- 10 15. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo está conjugado con otra fracción, tal como una fracción citotóxica, un radioisótopo, un fármaco o una citocina.
16. El anticuerpo de la reivindicación 15, que
- 15 i) se conjuga con una fracción citotóxica seleccionada del grupo que consiste en maitansina, caliqueamicina, duocarmicina, raquelmicina (CC-1065), monometil auristatina E, o un análogo, derivado o profármaco de cualquiera de ellos;
- ii) se conjuga con una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN α , IFN β , IFN γ , GM-CSF, CD40L, ligando de Flt3, factor de células madre, ancestim, y TNF α ; o
- 20 iii) se conjuga con un radioisótopo.
17. Un conjunto de secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos de una VH y una VL seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 y 5; 8 y 12; 15 y 19; 22 y 26; 29 y 33; 36 y 40; 43 y 44; 45 y 46; 47 y 48; 49 y 50; 51 y 52; 53 y 54; 55 y 56.
- 25 18. Un vector de expresión que comprende un conjunto de secuencias de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el vector codifica además una región constante unida operativamente a una cadena ligera y una región constante unida operativamente a una cadena pesada; o una combinación de dos vectores de expresión que codifican un conjunto de secuencias de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 17, en donde uno de los dos vectores codifica una secuencia de aminoácidos de la VL de la reivindicación 17 y además codifica una región constante unida operativamente a una cadena ligera, y el segundo vector de los dos vectores codifica una secuencia de aminoácidos de la VH de la reivindicación 17 y codifica además una región constante unida operativamente de una cadena pesada.
- 30 19. Una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante que produce un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 35 20. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 21. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso como medicamento.
- 45 22. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en el tratamiento de cáncer.
23. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, cáncer pancreático, cáncer testicular, melanoma maligno y cáncer de tejidos blandos.
- 50 24. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 23, en donde el anticuerpo es para el tratamiento del cáncer en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un agente quimioterapéutico.
- 55 25. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 60 26. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende células tumorales que coexpresan HER2 y EGFR y/o HER3.
27. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de cuello de útero/endometrial, cáncer de pulmón, melanoma maligno, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer testicular, un tumor de tejidos blandos como el sarcoma sinovial y el cáncer de vejiga.
- 65 28. Un método para producir un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, comprendiendo dicho

método las etapas de

- a) cultivar una célula hospedadora de la reivindicación 19, y
- b) purificar el anticuerpo a partir de los medios de cultivo.

- 5
29. Un método para detectar la presencia de HER2 en una muestra, que comprende:
- poner en contacto la muestra con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y HER2; y
 - analizar si se ha formado un complejo.
- 10
30. Un kit para detectar la presencia de HER2 en una muestra, que comprende
- un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16; e
 - instrucciones de uso del kit.
- 15

Figura 1A

IgHV5-51-1 / IGJH6-02 –Alineación de VH

```

IgHV5-51-1   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
TH1014-005 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
TH1014-060 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
TH1014-106 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
VH1014-041   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
VH1014-150   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
VH1014-067   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
VH1014-072   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
VH1014-163   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
VH1014-093   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
VH1014-044   EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
Consenso     EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ

IgHV5-51-1   GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICAR-----GMDVWGQGTITVTVSS
TH1014-005 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARQAGD--YYFYGMDVWGQGTITVTVSS
TH1014-060 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARHAGD--YYFDGIDVWGQGTITVTVSS
TH1014-106 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARLTGDFGFDYSGMDVWGQGTITVTVSS
VH1014-041   GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARQAGD--YYFFGLDVGQGTITVTVSS
VH1014-150   GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARQAGD--YYFYHGMVWGQGTITVTVSS
VH1014-067   GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARQAGD--YYFYHGLDVGQGTITVTVSS
VH1014-072   GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARQAGD--YYFFHGLDVGQGTITVTVSS
VH1014-163   GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARQAGD--YYFFHGLDVGQGTITVTVSS
VH1014-093   GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARQAGD--YYFFHGLDVGQGTITVTVSS
VH1014-044   GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARQAGD--YYFYHGMVWGQGTITVTVSS
Consenso     GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARXXXXXXXXXXGDXDVGQGTITVTVSS
    
```

Figura 1B

IgHV3-23-1 / IGHJ4-02 –Alineación de VH

IgHV3-23-1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG
TH1014-006 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYALITWVRQAPGKGLEWVSIIRGGAGSTYYADSVKG
 Consenso EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAXXWVRQAPGKGLEWVSIIXGXXGSTYYADSVKG

IgHV3-23-1 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-----YFDYWGQGITLTVSS
TH1014-006 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARIWGPFDYWGQGITLTVSS
 Consenso RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARIWGPFDYWGQGITLTVSS

Figura 1C

IgHV1-18-1 / IGHJ4-02 – Alineación de VH

IgHV1-18-1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG
TH1014-059 QVQLVQSGAEVKKPGASVVECKASGYFTFSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGKITIYAQKLQG
 Consenso QVQLVQSGAEVKKPGASVXXCKASGYFTFSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGXIXYAQKLQG

IgHV1-18-1 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR-----YFDYWGQGITLTVSS
TH1014-059 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSPLLWFEELYFDYWGQGITLTVSS
 Consenso RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSPLLWFEELYFDYWGQGITLTVSS

Figura 1D

IgHV1-69-4 / IGHJ4-02 –Alineación de VH

IgHV1-69-4 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYASISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG
TH1014-111 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG
 Consenso QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYXISWVRQAPGQXGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG

IgHV1-69-4 RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR-----YFDYWGQGITLTVSS
TH1014-111 RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDQEYSSXITTYWGQGITLTVSS
 Consenso RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDQEYSSXXXYWGQGITLTVSS

Figura 2A

IgKV3-20-01 / IGKJ4-01 – Alineación de VL

IgKV3-20-01 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-005 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-059 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-060 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-106 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-111 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-041 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-150 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-067 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-072 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-163 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-093 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-044 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
Consenso EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS

IgKV3-20-01 GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK
VL1014-005 GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK
VL1014-059 GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK
VL1014-060 GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK
VL1014-106 GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK
VL1014-111 GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK
VL1014-041 GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK
VL1014-150 GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK
VL1014-067 GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK
VL1014-072 GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK
VL1014-163 GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK
VL1014-093 GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK
VL1014-044 GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK
Consenso GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGKVEIK

Figura 2B

IgKV3-11-01 / IGKJ4-01 – Alineación de VL

IgKV3-11-01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS

VL1014-006 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS

Consenso EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS

IgKV3-11-01 GSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIK

VL1014-006 GSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIK

Consenso GSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIK

Figura 3A

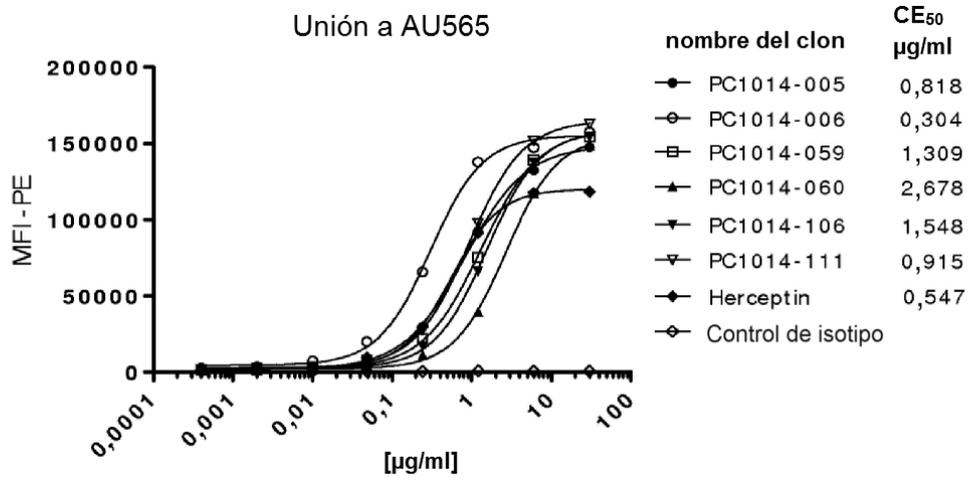


Figura 3B

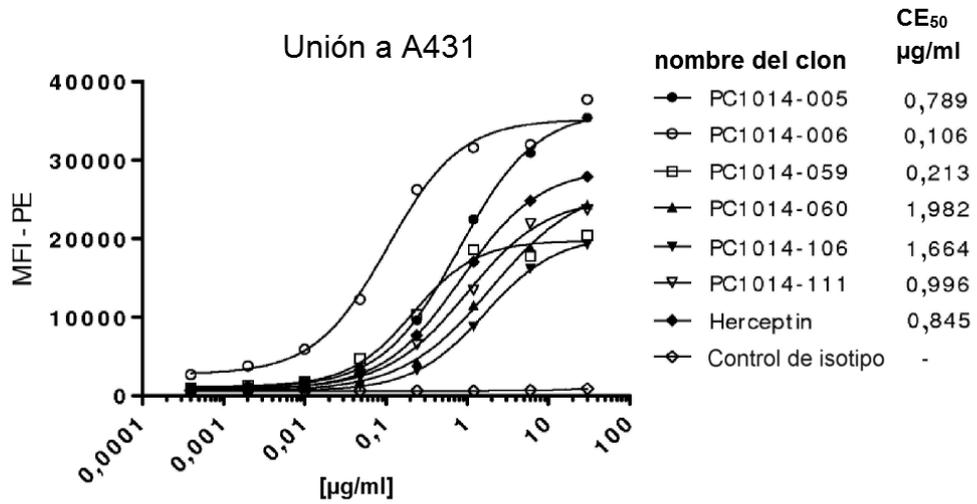


Figura 4

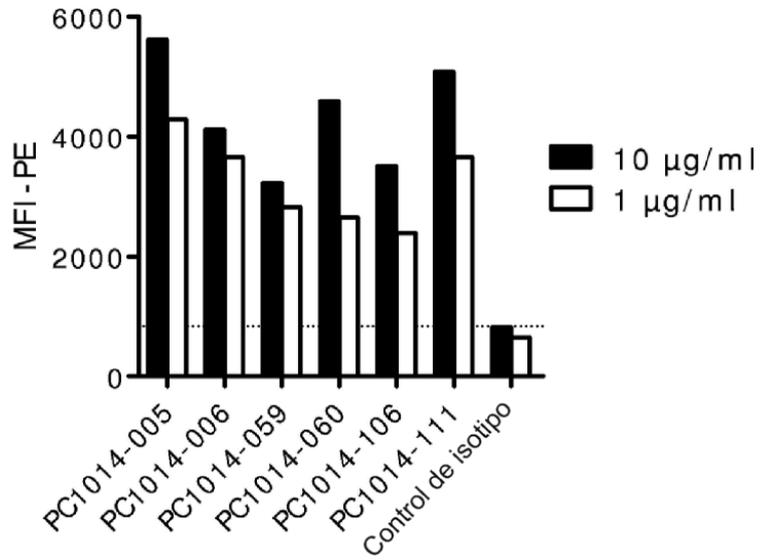


Figura 5

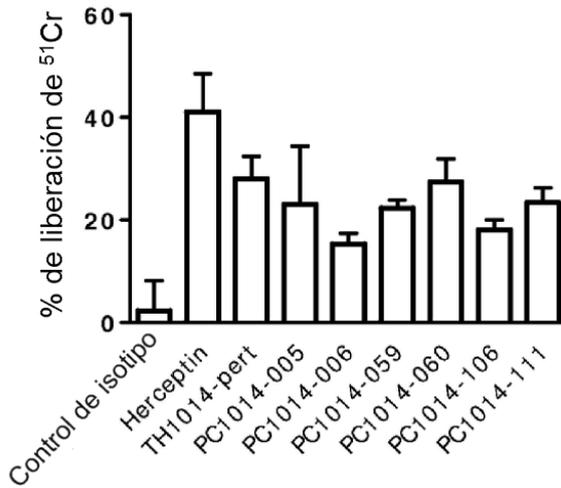


Figura 6

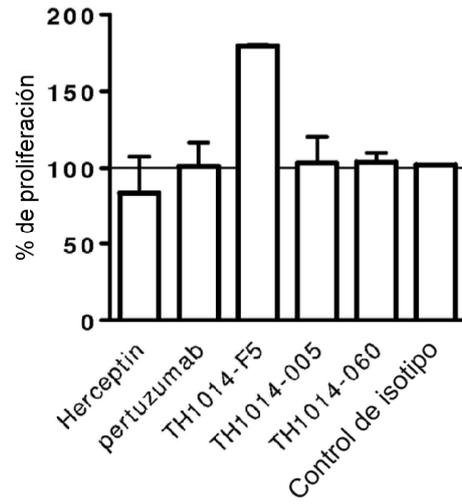


Figura 7A

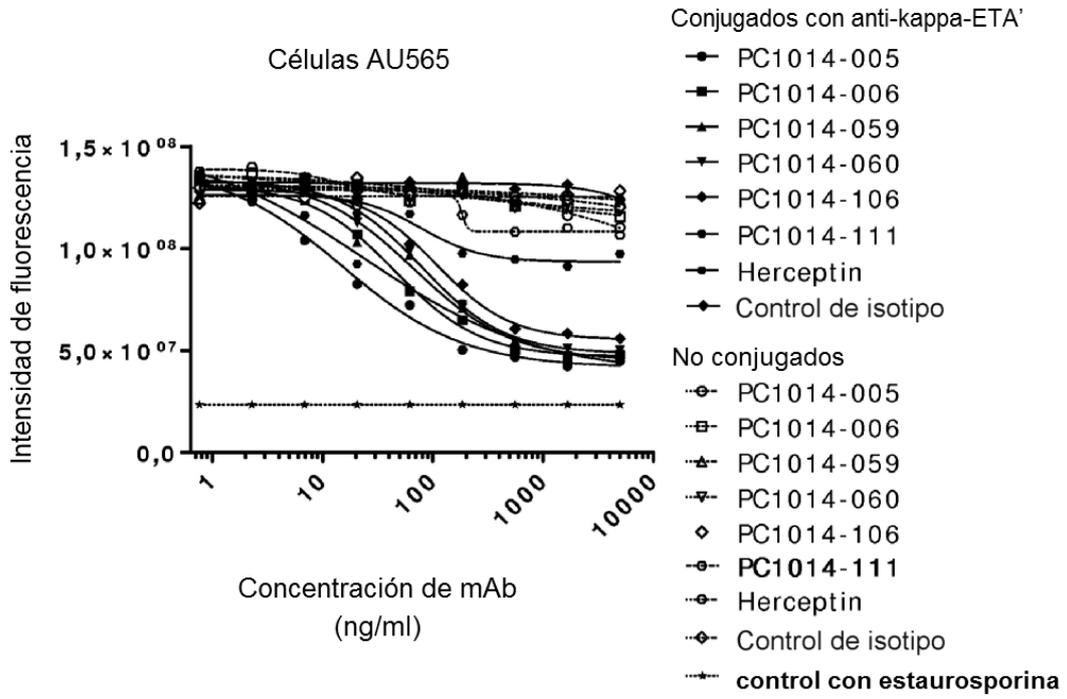


Figura 7B

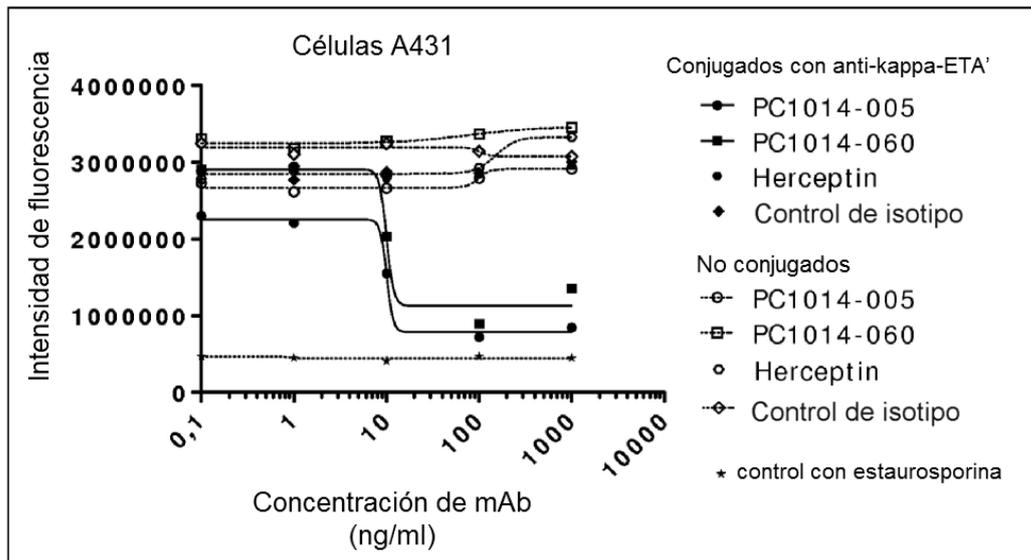


Figura 8

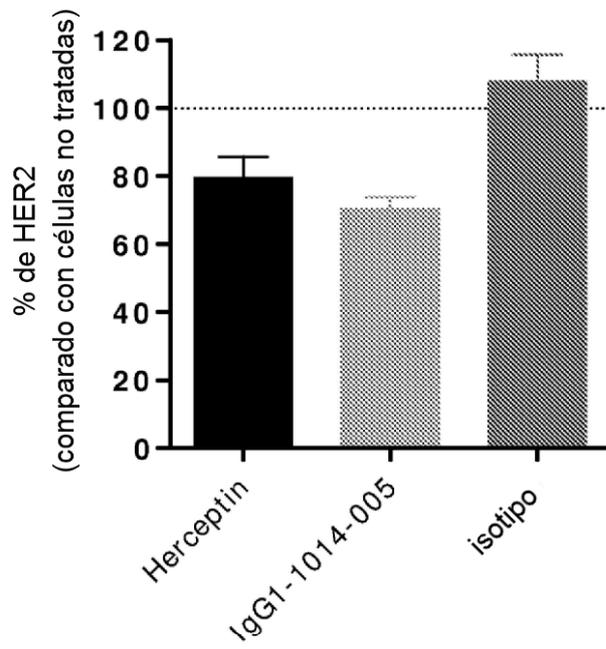


Figura 9

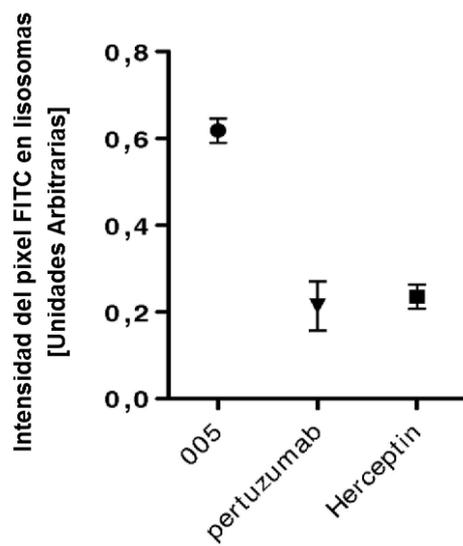


Figura 10

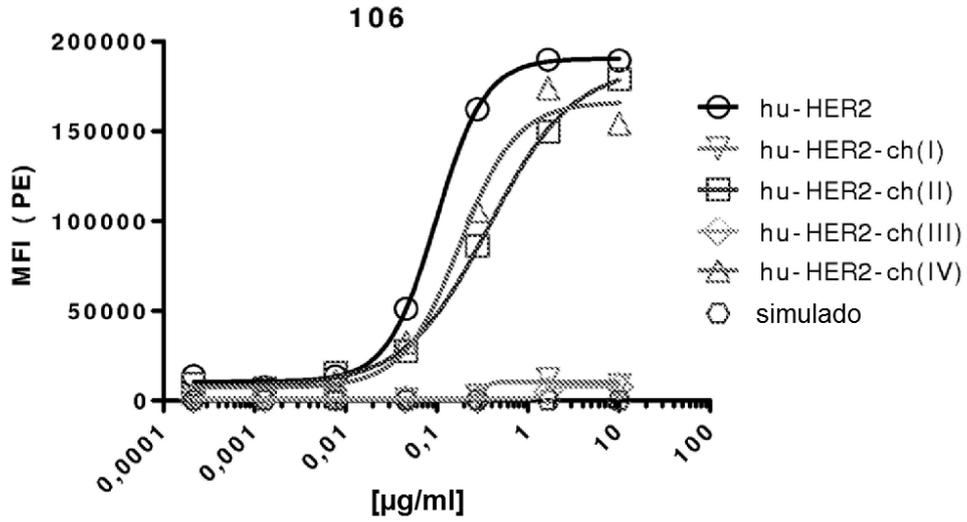


Figura 11A

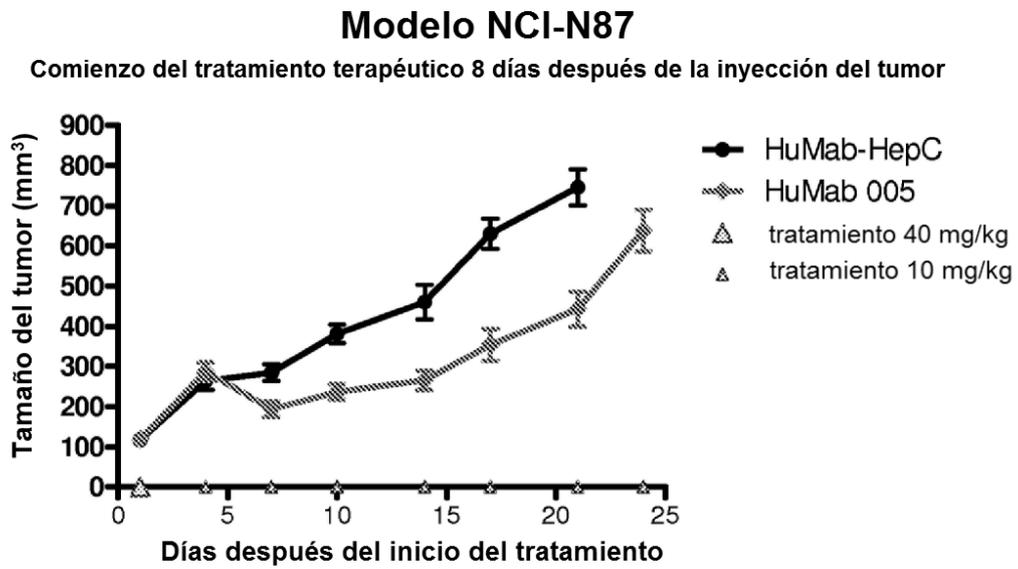


Figura 11B

Supervivencia

