

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 921**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2011 PCT/EP2011/058779**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11147986**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011 E 11722423 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2576621**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra HER2**

30 Prioridad:

20.04.2011 WO PCT/EP2011/056388

20.04.2011 DK 201100312

27.05.2010 DK 201000467

27.05.2010 US 349180 P

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

03.12.2019

73 Titular/es:

GENMAB A/S (100.0%)

Kalvebod Brygge 43

1560 Copenhagen V, DK

72 Inventor/es:

GOEIJ, BART DE;

HAIJ, SIMONE DE;

RIEDL, THILO;

HOET, RENÉ;

BAADSGAARD, OLE;

WINKEL, JAN VAN DE;

SATIJN, DAVID;

PARREN, PAUL;

LABRIJN, ARAN FRANK;

MEESTERS, JOYCE;

SCHUURMAN, JANINE y

BRINK, EDWARD N. VAN DEN

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 2 733 921 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 HER2

5

Campo de la invención

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

10

Antecedentes de la invención

El HER2 es un receptor tirosina cinasas de la superficie celular de 185 kDa y miembro de la familia del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que comprende cuatro receptores distintos: EGFR/ErbB-1, HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3, y HER4/ErbB-4. Se forman tanto homo como heterodímeros por los cuatro miembros de la familia de los EGFR, siendo HER2 la pareja de dimerización preferida y la más potentes para otros receptores ErbB (Graus-Porta et al., *Embo J* 1997;16:1647-1655; Tao et al., *J Cell Sci* 2008; 121:3207-3217). El HER2 se puede activar mediante la sobre expresión o por heterodimerización con otros ErbB que se pueden activar por la unión al ligando (Riese y Stern, *Bioessays* 1998;20:41-48). Para el HER2 no se había identificado ningún ligando. La activación de HER2 da lugar a la fosforilación del receptor, que desencadena una cascada de señales corriente abajo a través de múltiples rutas de señalización tal como MAPK, fosfoinositol 3-cinasa/AKT, JAK/STAT y PKC, que da como resultado en último término en la regulación de múltiples funciones celulares, tales como el crecimiento, supervivencia y diferenciación (Huang et al., *Expert Opin Biol T HER2* 2009;9:97-110).

15

20

25

30

35

La mayoría de la atención sobre el HER2 en los tumores se ha enfocado en su papel en el cáncer de mama, en el que la sobre expresión de HER2 se ha informado en aproximadamente en el 20 % de los casos y se correlaciona por su 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 de en el cáncer de mama, la expresión de HER2 también se ha asociado con otros tipos de carcinomas humanos, incluyendo el cáncer de próstata, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer esofágico y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Garcia 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).

40

45

50

El trastuzumab (Herceptin®) es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante dirigido contra el dominio IV de la proteína HER2 bloqueando de esta manera la homodimerización de HER2 independiente de ligando, y en menos extensión la heterodimerización de HER2 con otros miembros de la familia en células con alta sobre expresión de HER2 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 las células con niveles de expresión de HER2 modestos, se descubrió que el trastuzumab inhibe la formación de heterodímeros HER2/EGFR (Wehrman et al., (2006), *supra*; Schmitz et al., *Exp Cell Res* 2009;315:659-670). El trastuzumab interviene en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y evita el desprendimiento del ectodominio, lo que por otra parte resultaría en la formación de una proteína activa truncada constitutivamente en las células que sobre expresan HER2. También se ha informado de la inhibición de la proliferación tanto *in vitro* como *in vivo* de las células tumorales que expresan altos niveles de HER2 para el trastuzumab (revisado en Nahta y Esteva, *Oncogene* 2007;26:3637-3643). El Herceptin® se ha aprobado tanto para el tratamiento de primera línea como de adyuvante del cáncer de mama metastático que sobre expresa HER2, sea en combinación con quimioterapia, o como agente único después de uno o más regímenes de quimioterapia. Se ha descubierto que el trastuzumab es eficaz solo en el 20-50 % de los pacientes de tumor de mama que sobre expresan HER2 y muchos de los que responden inicialmente presentan recaídas después de pocos meses (Dinh et al., *Clin Adv Hematol Oncol* 2007;5:707-717). Una divulgación adicional del Trastuzumab se puede encontrar en Hudis, Clifford A, *New England Journal of Medicine*, 2007, Vol. 357, 1: 39-51.

55

60

65

El Pertuzumab (Omnitarg™) es otro anticuerpo monoclonal humanizado. Se dirige contra el dominio II de la proteína HER2, dando como resultado la inhibición de la heterodimerización inducida por ligando (es decir, la dimerización del HER2 con otro miembro de la familia ErbB al cual se ha unido un ligando); un mecanismo del que se ha informado que no son estrictamente necesarios altos niveles de expresión de HER2 (Franklin et al., *Cancer Cell* 2004;5:317-328.). Aunque el pertuzumab también interviene en la ADCC, el mecanismo de acción principal del pertuzumab se basa en su bloqueo de la dimerización (Hughes et al., *Mol Cancer T HER2* 2009;8:1885-1892). Además, se descubrió que el pertuzumab aumenta la internalización de EGFR y su regulación negativa inhibiendo la formación de heterodímeros EGFR/HER2, que la cual por otra parte mantiene ligado el EGFR a la membrana plasmática (Hughes et al., 2009, *supra*). 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 del pertuzumab y el trastuzumab resultan de manera indicadora en el aumento de efectos antitumorales y en la eficacia cuando se combinan en pacientes que progresan durante la terapia anterior al trastuzumab (Baselga et al., *J Clin Oncol* 2010;28:1138-1144), y está en proceso un ensayo en

fase III para evaluar esta combinación de anticuerpos junto con Docetaxel en cánceres de mama metastáticos positivos a HER2 no tratados previamente. Una divulgación adicional del pertuzumab se encuentra en Langdon et al., *Drugs of the Future*, 2008, Vol. 33, 2: 123-130.

5 Una estrategia alternativa para mejorar la terapia con anticuerpos dirigidos se suministrando células o fármacos citotóxicos específicamente a las células de cáncer que expresen 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 células T CD3. Al unirse, se forma un complejo de células T, células tumorales y células efectoras que se unen al Fc, dando lugar a la destrucción de las células tumorales (Muller y Kontermann, *BioDrugs* 2010;24:89-98.). El ertumaxomab es uno de dichos anticuerpos trifuncionales contra HER2 que induce toxicidad en líneas celulares con baja expresión de HER2 y que está en Fase II de desarrollo clínico en cáncer de mama metastático (Jones et al., *Lancet Oncol* 2009;10:1179-1187 y Kiewe et al., *Clin Cancer Res* 2006;12:3085-3091).

15 Un conjugado de anticuerpo HER2-fármaco (ADC) está actualmente en desarrollo clínico. El T-DM1 consiste en trastuzumab conjugado con la toxina fúngica maitansina. En los ensayos en Fase II se han publicado las respuestas en una cohorte de pacientes muy pretratada incluyendo una terapia anterior con trastuzumab y/o lapatinib Burris et al, 2011, *J Clin Oncol* 29: 398-405 y Lewis Phillips et al., *Cancer Res* 2008;68:9280-9290). Se han publicado los datos preliminares de un ensayo de Fase II que determina la eficacia y la seguridad del T-DM1, frente al trastuzumab más el docetaxel en pacientes con cáncer de mama metastático positivo a HER2 sin quimioterapia previa para la enfermedad metastática (Perez et al, Abstract BA3, European Society for Medical Oncology meeting 2010). Está en curso un ensayo en Fase III para evaluar la eficacia y seguridad de T-DM frente a la capecitabina + lapatinib en pacientes con cáncer de mama positivo a HER2 avanzado localmente o metastático que recibieron una terapia anterior con trastuzumab.

25 Mientras que hay muchos factores implicados en la selección de una terapia dirigida con anticuerpos adecuados para HER2, es normalmente una ventaja para una estrategia ADC que el complejo anticuerpo-HER2 se internalice eficazmente al unirse con el anticuerpo. Los estudios sobre anticuerpos HER2 murinos han demostrado que ciertas combinaciones de anticuerpos favorecen la endocitosis de HER2 (Ben-Kasus et al., *PNAS* 2009;106:3294-9). Se ha publicado que los anticuerpos HER2 humanos F5 y C1 internalizan relativamente rápido por sí mismos y al unirse al mismo epítipo (documentos WO 99/55367 y WO 2006/116107). En comparación con el EGFR, sin embargo, la internalización de HER2 está incapacitada. Además, los homodímeros de EGFR internalizan mucho más eficazmente que los homodímeros de HER2 (Dinh et al., *Clin Adv Hematol Oncol* 2007;5:707-717). El EGFR y también el HER3, puede aumentar la endocitosis de HER2 por la formación de EGFR/HER2 y los heterodímeros HER3/HER2, respectivamente (Baulida et al., *J Biol Chem* 1996;271:5251-5257; Pedersen NM, et al., *Mol Cancer Res* 2009;7:275-84).

Los documentos WO 01/09187 y WO 2009/055074 desvelan varios anticuerpos HER2.

40 Los complejos mecanismos que regulan la función de HER2 garantizan investigaciones adicionales en estrategias nuevas y optimizadas contra este proto-oncogén. En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de productos eficaces y seguros para tratar las enfermedades relacionadas con HER2, tales como el cáncer.

Sumario de la invención

45 Es un objetivo de la presente invención proporcionar nuevos anticuerpos HER2 monoclonales altamente específicos y eficaces para su uso médico. Los anticuerpos de la invención presentan características de unión al HER2 que se diferencian de los anticuerpos descritos en la técnica. Particularmente, aunque los anticuerpos aparentemente se unen a segmentos de HER2 que se solapan con los que se unen al trastuzumab como se muestra en un ensayo de unión de bloqueo cruzado con HER2, los nuevos anticuerpos se caracterizan por una eficacia mayor en la destrucción de células tumorales que expresan HER2 en un ensayo de ADC, internalización mejorada y/u otras ventajas sobre los anticuerpos conocidos.

55 Preferentemente, los anticuerpos que se desvelan en el presente documento son completamente humanos, se unen a nuevos epítopos, y/o tienen propiedades favorables para su uso terapéutico en pacientes humanos. Las propiedades ejemplares incluyen, pero no se limitan a, características favorables de unión a las células cancerosas que expresan HER2 humano a altos o bajos niveles, unión específicas a células epiteliales de rhesus que expresan un HER2 ortólogo, eficiente internalización al unirse a HER2, alta capacidad para destruir células cancerosas que expresan niveles altos o bajos de HER2 cuando se administra como un ADC, promoción de la proliferación de células que expresan HER2 menor que F5, un efecto inhibitor neutro sobre la proliferación de células cancerosas que expresan HER2, y proporcionan una destrucción eficaz de células mediada por ADCC de células que expresan HER2, así como cualquier combinación de los anteriores.

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

65

Breve descripción de los dibujos

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

Figura 2: Alineamiento de secuencias de la región variable de cadena ligera (VL) de un HuMab con secuencias de la línea germinal (referencia) (A-B). En cada secuencia de VL, se resaltan los aminoácidos que se diferencian de los de la línea germinal (referencia) en posiciones específicas. En la Figura 2A, todas las secuencias de VL se derivan del mismo segmento V (IgKV1-12-01), pero se diferencian en el segmento J entre los anticuerpos. Se muestran las secuencias VL de consenso, donde "X" indica las posiciones en las que son posibles aminoácidos alternativos (seleccionados de entre los alineados en la posición indicada). Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas en cada secuencia de VL. Las secuencias de CDR de consenso se definen adicionalmente en la Tabla 4.

Figura 3: Curvas de unión de anticuerpos HER2 contra líneas celulares que expresan HER2 alto (AU565) (A, B) y bajo (A431) (C, D), determinado según se describe en el Ejemplo 12. Los datos que se muestran son la media de intensidades de fluorescencia (MFI) de un experimento representativo de cada línea celular. Los valores de la CE_{50} indican las afinidades aparentes.

Figura 4: Unión de anticuerpos al HER2 expresado en células epiteliales de monos Rhesus. Los datos que se muestran son la media de intensidades de fluorescencia (MFI) de un experimento descrito en el Ejemplo 13.

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

Figura 6: Efecto de los anticuerpos HER2 sobre la proliferación de células AU565 según se compara con células sin tratar (fijado como 100 %). Los datos que se muestran son los porcentajes de proliferación de las células AU565 en comparación con las células sin tratar medidos en tres experimentos independientes +- la desviación típica. * Significativo ($P < 0,05$). Véase el Ejemplo 16 para más detalles.

Figura 7: Porcentaje de células MCF7 viables estimuladas con Heregulina- β 1 y tratadas con los anticuerpos HER2 indicados, con respecto a células estimuladas solo con Heregulina- β 1. Como control, se muestra en porcentaje de proliferación de células no estimuladas (ninguno). Los datos se obtuvieron en tres experimentos independientes +- la desv. típ. * Inhibición significativa de proliferación inducida por Heregulina- β 1 ($P < 0,05$). Véase el Ejemplo 17 para más detalles.

Figura 8: Ensayo ADC, que muestra la destrucción de células AU565 (A, B) o células A431 (C, D) mediante anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA'. (A, B) Los datos que se muestran son intensidades de fluorescencia (FI) de un experimento representativo con células AU565 tratadas con anticuerpos HER2 conjugados y no conjugados con anti-kappa-ETA'. (C, D) Los datos que se muestran son la media de las intensidades de fluorescencia (FI) de un experimento representativo con células A431 tratadas con anticuerpos HER2 conjugados y no conjugados con anti-kappa-ETA'. Véase el Ejemplo 18 para más detalles.

Figura 9: Destrucción de células A431 inducida por anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 preincubados por anti-kappa-ETA'. La viabilidad de las células A431 después de 3 días de incubación con anticuerpos HER2, preincubadas con anti-kappa-ETA'. La viabilidad celular se cuantificó utilizando azul Alamar. Los datos que se muestran son intensidades de fluorescencia (FI) de un experimento con células A431 tratadas con anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA' y anticuerpos HER2 x HER2 biespecíficos. Se utilizó estaurosporina como control positivo, mientras que se utilizó un anticuerpo de control como control negativo.

Figura 10: Las moléculas HER2 x HER2 biespecíficas inducían la modulación negativa del receptor HER2. Porcentaje relativo de la expresión de los niveles de expresión de HER2 en lisados de células AU565 tras 3 días de incubación con 10 μ g/ml de mAb. La cantidad de HER2 se cuantificó utilizando un ELISA de captura específica de HER2 y se representa como el porcentaje de inhibición en comparación con células sin tratar. Los datos mostrados son la media de dos experimentos más la desviación típica, excepto en las combinaciones de anticuerpos IgG1 mono-específicos que se ensayaron una vez.

Figura 11: Análisis de colocalización de anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 (FITC) con el marcador lisosómico LAMP1 (Cy5). Intensidad de píxeles de FITC que se solapan con Cy5 de distintos anticuerpos HER2 mono-específicos y anticuerpos HER2 x HER2 biespecíficos (Figura 11(A)) Se representa la intensidad de píxeles FITC en píxeles positivos a LAMP/Cy5 de tres imágenes diferentes para cada anticuerpo ensayado. Los mono-específicos muestran intensidades de píxeles de FITC menores en píxeles positivos a LAMP/Cy5 en comparación con los biespecíficos. La Figura 11(B) representa el valor medio de intensidad de píxeles de FITC por píxel positivo calculado de LAMP/Cy5 de las tres imágenes diferentes. Estos resultados juntos indican que tras la internalización se localizan en vesículas positivas a Lamp/Cy5 positivos mayores niveles de anticuerpos biespecíficos, en comparación con los anticuerpos mono-específicos.

Figura 12: Inhibición de la proliferación por anticuerpos HER-2 mono y biespecíficos. Se sembraron las células AU565 en presencia de 10 μ g/ml del anticuerpo HER2 o el anticuerpo biespecífico HER2 x HER2 en medio de cultivo celular libre de suero. Después de tres días, la cantidad de células viables se cuantificó con azul Alamar y se presentó la viabilidad celular como un porcentaje con respecto a las células sin tratar. Se utilizó un isotipo de

anticuerpo de control como control negativo. Los datos que se muestran son los porcentajes de células AU565 viables en comparación con las células sin tratar medidos en cinco veces \pm la desviación típica. * indica que solo se representó un dato puntual.

Figura 13: Citotoxicidad mediada por células T de células AU565 mediante anticuerpos biespecíficos HER2 x CD3, así como por N297Q mutantes mediante anticuerpos biespecíficos HER2 x CD3 (indicando biespecíficos como Dúo en la figura).

Figura 14: El anticuerpo inducía la regulación negativa de HER2. Porcentaje relativo de HER2 expresado en lisados de células AU565 tras 3 días de incubación con 10 μ g/ml de anticuerpo. La cantidad de HER2 se cuantificó utilizando un ELISA de captura específica de HER2 y se representa como el porcentaje de inhibición con respecto a las células sin tratar. Los datos mostrados son la media de tres experimentos \pm la desviación típica.

Figura 15: Análisis de colocalización de anticuerpos HER2 (FITC) con el marcador lisosómico LAMP1 (Cy5). La intensidad de los píxeles de FITC se solapa con Cy5 en distintos anticuerpos HER2 mono-específicos. Se representa la intensidad de píxeles FITC en píxeles positivos a LAMP1/Cy5 de tres imágenes diferentes para cada anticuerpo. Los anticuerpos 098 y 153 del Grupo de 3 muestran mayores intensidades de píxeles FITC en los compartimentos positivos a LAMP1/Cy5 en comparación con los anticuerpos 025 y pertuzumab del Grupo 2 y 169 y Herceptin del Grupo 1.

Figura 16: Unión del anticuerpo HER2 a células CHO-S transfectadas con diferentes construcciones HER2 ECD analizadas por medio de citometría de flujo. Hu-HER2 = HER2 completamente humano, hu-HER2-ch(I) CR1 = hu-HER2 con el dominio I de pollo, hu-HER2-ch (II) = hu-HER2 con el dominio II de pollo, hu-HER2-ch (III) = hu-HER2 con el dominio III de pollo y hu-HER2-ch (IV) = hu-HER2 con el dominio IV de pollo. Los datos son la media de intensidades de fluorescencia (MFI) de un anticuerpo representativo, TH1014-153. Véase el Ejemplo 25 para más detalles.

Figura 17: Efecto *in vivo* de los Hu-mAb de HER2 en un modelo de xenoinjerto de carcinoma gástrico humano NCI-N87 en ratones CB.17 hembras con inmunodeficiencia combinada grave (SCID). Los datos que se muestran son la media de tamaños tumorales \pm S.E.M. por grupo (n = 10 ratones por grupo) (A) y la supervivencia (B). Véase el Ejemplo 29 para más detalles.

Figura 18: Efecto *in vivo* de los humAb HER2 en xenoinjertos de tumor de mama BT-474 en ratones atímicos Balb/C. Los datos que se muestran son la media de tamaños tumorales \pm S.E.M. por grupo (n = 8 ratones por grupo) (A) y la supervivencia (B). Véase el Ejemplo 30 para más 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 (Swiss Prot P04626) e incluye cualquier variante, isoforma y especie homóloga de HER2 que se expresan naturalmente por las células, incluyendo células tumorales, o que se expresen en células transfectadas con el gen HER2. Las especies homólogas incluyen el HER2 de mono rhesus (macaca mulatta; N.º de registro en Genbank GI: 109114897).

El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glicoproteínas 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 conectadas por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas se ha caracterizado bien. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). En resumen, cada cadena pesada está compuesta normalmente por una región variable de cadena pesada (que se abrevia en el presente documento como V_H o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada normalmente está compuesta por tres dominios, C_{H1} , C_{H2} , y C_{H3} . Cada cadena ligera está compuesta normalmente por una región variable de cadena ligera (que se abrevia en el presente documento como V_L o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera normalmente está compuesta por 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 su secuencia y/o en forma de bucles definidos estructuralmente), llamadas también regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones marco conservadas (FR). Cada V_H y V_L están compuestas normalmente por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al 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 de que se establezca otra cosa o se contradiga por el contexto, las secuencias de CDR en el presente documento se identifican según las reglas IMGT (Brochet X., Nucl Acids Res. 2008;36: W503-508 y 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 de una secuencia de anticuerpo también se puede llevar a cabo por 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) (las frases tales como "numeración de resto del dominio variable como en Kabat", "posición Kabat" o "de acuerdo con Kabat" en el presente documento se refieren a este sistema de numeración). Particularmente, para la numeración de aminoácidos de la región constante, se puede utilizar el sistema de numeración de índice EU de acuerdo con Kabat et al, *supra*. La numeración de restos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo

determinado alineando las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia "de referencia" numerada con Kabat.

5 El término "anticuerpo" (Ab) 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 los mismos, que tenga la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas normales con una semivida o periodos 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 periodo definido funcionalmente relevante (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, aumentar, y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno y/o 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 un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden intervenir en la unión de las inmunoglobulinas a tejidos o factores huéspedes, incluyendo distintas células del sistema inmunitario (tales como las células efectoras) y componentes del sistema de complemento tales como C1q, el primer componente en la ruta clásica de activación del complemento. Un anticuerpo HER2 también puede ser un anticuerpo biespecífico, un diacuerpo, o una molécula similar (véase, por ejemplo, PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993) para la descripción de los diacuerpos). Además, los anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y similares, que se proporcionan en la presente invención se pueden unir a cualquier diana adecuada además de a una parte del HER2. Como se ha indicado anteriormente, el término anticuerpo en el presente documento, a menos de que se establezca otra cosa o se contradiga claramente por el contexto, incluye fragmentos de anticuerpo que sean fragmentos de unión al antígeno, es decir, que mantengan la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión al antígeno englobados 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 descrito en el documento WO 2007059782 (Genmab); (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región 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 único 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 que también se denominan dominio anticuerpos (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90); (vi) de camélidos o nanocuerpos (Revetts et al; Expert Opin Biol Ther. Ene 2005;5(1):111-24) y (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, sean codificados por genes distintos, se pueden unir utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que hace posible que se produzcan como una cadena proteica única en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidos como anticuerpos de cadena sencilla o Fv de cadena sencilla (scFv), véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) y Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Dichos anticuerpos de cadena sencilla están englobados en el término anticuerpo a menos de que se señale otra cosa o está claramente indicado por el contexto. Aunque dichos fragmentos se incluyen en general en el significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno independientemente son características únicas de la presente invención, que presentan diferentes propiedades biológicas y utilidades. Estos y otros fragmentos de anticuerpo útiles en el contexto de la presente invención, así como los formatos biespecíficos de dichos fragmentos, se exponen posteriormente en el presente documento. También se debería entender que el término anticuerpo, a menos de que se especifique otra cosa, también incluye los anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos tipo anticuerpo, tales como los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos humanizados, y fragmentos de anticuerpo que mantienen la capacidad para unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión al antígeno) proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como la escisión enzimática, la síntesis peptídica, y técnicas recombinantes. Un anticuerpo según se genera puede poseer un isotipo.

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

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

60 Un "anticuerpo deficiente en la función efectora" o un anticuerpo "deficiente en función efectora" se refiere a un anticuerpo que tiene reducida significativamente o no tiene la capacidad para activar uno o más mecanismos efectores, tales como activación del complemento o unión al receptor de Fc. Por lo tanto, los anticuerpos deficientes en función efectora tienen significativamente reducida o no tienen la capacidad de intervenir en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Un ejemplo de dicho anticuerpo es la IgG4.

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

La expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, tiene la intención de 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 aminoácido no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como un ratón, se han injertado en las secuencias marco conservadas humanas.

Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo humano se "deriva de" una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene a partir de un sistema que utiliza secuencias de inmunoglobulinas humanas, por ejemplo, inmunizando un ratón transgénico que tiene genes de inmunoglobulina humana o explorando una biblioteca genética de inmunoglobulinas humanas y donde el anticuerpo humano seleccionado es al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, por ejemplo, al menos un 96 %, tal como al menos un 97 %, por ejemplo, al menos un 98 %, o tal como al menos un 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulinas de la línea germinal. Normalmente, aparte de la CD3 de cadena pesada, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de la línea germinal humana en particular presentará no 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 diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

Preferentemente, el anticuerpo de la presente divulgación está aislado. Un "anticuerpo aislado", como se utiliza en el presente documento, tiene la intención de referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tengan especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a HER2 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unan específicamente a antígenos distintos de HER2). Un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de HER2, puede tener, sin embargo, una reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (tales como especies de HER2 homólogas). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o químico. En una realización de la presente invención, se combinan dos o más anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades de unión al antígeno 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 manera cruzada con" indica que los dos o más anticuerpos compiten por la unión a HER2, por ejemplo, compiten por la unión a HER2 en el ensayo descrito en el Ejemplo 14. Un anticuerpo "bloquea" o "bloquea de manera cruzada" uno o más de otros anticuerpos en cuanto a la unión con HER2 si el anticuerpo compite con el uno o más anticuerpos distintos un 25 % o más, representando un 25 %-74 % un "bloqueo parcial" y representando el 75 %-100 % el "bloqueo completo", preferentemente como se determina utilizando el ensayo del Ejemplo 14. Para algunos pares de anticuerpos, la competición o bloqueo en el ensayo del Ejemplo solamente se observa cuando un anticuerpo está revistiendo la placa y el otro se utiliza para competir y no viceversa. A menos de que se defina otra cosa o sea negado por el contexto, las expresiones "compite con", "compite de manera cruzada con", "bloquea" o "bloquea de manera cruzada" cuando se utilizan en el presente documento tienen la intención de cubrir también dichos pares de anticuerpos.

El término "epítipo" significa un determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos consisten habitualmente en agrupamientos de superficie de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión del primero, pero no del segundo se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítipo puede comprender restos de aminoácido implicados directamente en la unión (también llamados el componente inmunodominante del epítipo) y otros restos de aminoácido, que no está implicados directamente en la unión, tales como restos de aminoácido que están cubiertos o bloqueados eficazmente por el péptido de unión específicamente antigénico (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión específicamente antigénico).

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente documento se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición molecular única. Una composición de anticuerpos monoclonales presenta una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. En consecuencia, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tiene regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden generar mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida a partir de un animal transgénico o transcromosómico no humano, tal como un ratón transgénico, que tenga un genoma que comprenda un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera, fusionado con una célula inmortalizada.

Como se utiliza en el presente documento, el término "unión" en el contexto de la unión de un anticuerpo contra un antígeno o epítipo predeterminado normalmente es una unión con una afinidad que se corresponde a una K_D 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 plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 utilizando el antígeno como ligando y el anticuerpo como analito, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que se corresponde con una K_D que es al menos 100 veces menor, tal como al menos 1000 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 por la unión con un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno relacionado estrechamente. La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la K_D del anticuerpo, de manera que cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser al menos de 10.000 veces.

El término " k_d " (s^{-1}), como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. También se hace referencia a dicho valor como el valor k_{off} .

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

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

El término " K_A " (M^{-1}), como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo k_a entre k_d .

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "inhibe la proliferación" (por ejemplo, en referencia a las células, tales como las células tumorales) tiene la intención de incluir cualquier descenso 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 al menos aproximadamente en un 10 %, al menos aproximadamente en un 20 %, al menos aproximadamente en un 30 %, o al menos como mucho como un anticuerpo de referencia tal como el trastuzumab, por ejemplo, como se determina por un ensayo de los Ejemplos, por ejemplo, el Ejemplo 16.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "promueve la proliferación" (por ejemplo, en referencia a las células, tales como las células tumorales) tiene la intención de 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 al menos aproximadamente en un 10 %, al menos aproximadamente en un 20 %, al menos aproximadamente en un 30 %, o al menos como mucho como un anticuerpo de referencia tal como el F5, por ejemplo, como se determina por un ensayo de los Ejemplos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "internalización", cuando se utiliza en el contexto de un anticuerpo HER2 incluye cualquier mecanismo por el que se internaliza el anticuerpo en una célula que expresa HER2 a partir de la superficie celular y/o del medio circundante, por ejemplo, mediante endocitosis. La internalización de un anticuerpo se puede evaluar utilizando un ensayo directo midiendo la cantidad de anticuerpo internalizado (tal como, por ejemplo, el ensayo de fab-CypHer5E descrito en el Ejemplo 18), o un ensayo indirecto en el que se mide el efecto de un conjugado anticuerpo-toxina 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 V_L , región V_H , o una o más CDR de los anticuerpos de los ejemplos. Una variante funcional de una V_L , V_H , o CDR utilizada en el contexto de un anticuerpo HER2 sigue permitiendo que el anticuerpo mantenga al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo parental y en algunos casos tal como un anticuerpo HER2 puede asociarse con mayor afinidad, selectividad y/o especificidad del anticuerpo parental.

Dichas variantes funcionales normalmente mantienen una identidad de secuencia significativa con respecto al anticuerpo parental. El porcentaje de identidad entre dos secuencias en una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el % de homología = n° de posiciones idénticas /total de n° de posiciones $\times 100$), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se necesita introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede determinarse, por ejemplo, utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) utilizando una tabla de pesos de restos PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y

Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453(1970) algoritmo.

Las variantes ejemplares proporcionadas en la presente divulgación incluyen las que se diferencian de las secuencias VH y/o VH de un anticuerpo parental que se muestran en las Figuras 1 y 2 en una o más posiciones de aminoácidos "variantes", señaladas con una "X" en la secuencia de consenso correspondiente. Las variantes preferidas son en las que el nuevo aminoácido se selecciona de los de 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 adicionalmente, la secuencia de las variantes de VH, VL o CDR puede ser diferente de la secuencia del VH, VL o CDR del anticuerpo parental principalmente por sustituciones conservadoras; por ejemplo, al menos 10, tal como al menos 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 de las sustituciones en la variante son sustituciones de un resto de aminoácido conservadoras.

En el contexto de la presente divulgación, las sustituciones conservadoras se pueden definir por sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejados en la siguiente tabla:

15

Clases de restos de aminoácidos para sustituciones conservadoras

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

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

La expresión "animal transgénico no humano" se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas de cadena ligera y/o pesada humanas (sea integrados o no integrados 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 cadena ligera humana y o un transgén de cadena pesada humana o un transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpos HER2 humanos cuando se inmuniza con el antígeno HER2 y/o células que expresan HER2. El transgén de cadena pesada humana se puede integrar en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso en ratones transgénicos, por ejemplo, un ratón HuMab, tal como los ratones HCo7, HCo12, o HCo17, o el transgén de cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es el caso de ratones transcromosómicos KM como se describe en el documento WO 02/43478. Ratones similares, que tienen un repertorio genético de Ab humanos, incluyen HCo7 y HCo20 (véase, por ejemplo, el documento WO 2009097006). Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos (a los que se hace referencia colectivamente en el presente documento como "ratones transgénicos") son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra un antígeno determinado (tal como IgG, IgA, IgM, IgD y/o IgE) sometiéndolos a una recombinación V-D-J y cambio de isotipo. El animal transgénico no humano también se puede utilizar para la producción de anticuerpos contra un antígeno específico introduciendo genes que codifican dicho anticuerpo específico, por ejemplo, uniendo operativamente los genes a un gen que se expresa en la leche del animal.

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

45

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

50

Un anticuerpo "anti-idiotípico" es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo.

55

Aspectos adicionales y realizaciones de la invención

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

5 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden producir, por ejemplo, mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), o se puede producir por métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) y Marks et al.,
10 J. Mol. Biol. 222, 581-597(1991). Los anticuerpos monoclonales se pueden obtenerse a partir de cualquier fuente adecuada. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden obtener anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas preparados a partir de células B esplénicas murinas obtenidas 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 también se pueden obtener a partir de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos inmunizados o mamíferos no humanos tales como ratas, perros, primates, etc.

El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra HER2 pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que tienen más partes del sistema inmunitario humano que del sistema de ratón. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen
20 los ratones a los que se hace referencia en el presente documento como ratones HuMAb y ratones KM respectivamente, y a los que se hace referencia colectivamente en el presente documento como "ratones transgénicos".

El ratón HuMAb contiene miniloci genéticos de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana sin reordenar de cadena pesada (μ y γ) y cadena ligera κ , junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de cadena μ y κ (Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)). En consecuencia, los ratones presentan una expresión reducida de la IgM de ratón o κ en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos, se someten a un cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales de una IgG, κ humana de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), *supra*; 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 ratones HuMAb se describe con 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.

Los ratones HCo7, HCo12, HCo17 y HCo20 tienen una alteración JKD en sus genes endógenos de cadena ligera (κ) (como se describe en Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)), una alteración CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424), y un transgén de cadena ligera kappa humana KCo5 (como se describe en Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)). Adicionalmente, los ratones HCo7 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo7 (como se describe en el documento US 5.770.429), los ratones HCo12 tiene el transgén de cadena pesada humana HCo12 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/14424), los ratones HCo17 tiene el transgén de cadena pesada humana HCo17 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/09187) y los ratones HCo20 tienen el transgén de cadena pesada humana HCo20. Los ratones resultantes expresan transgenes de cadena pesada y cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana en un entorno homocigoto por alteración de los loci endógenos de cadena pesada y ligera kappa de ratón.

En la estirpe KM de ratones, el gen endógeno de cadena ligera kappa de ratón se ha alterado de manera homocigota como se describe en Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993) y el gen endógeno de cadena pesada de ratón se ha alterado de manera homocigota como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/09187. Esta estirpe de ratón tiene un transgén de cadena ligera kappa humana KCo5, como se describe en Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Esta estirpe de ratón también tiene un transcromosoma de cadena pesada humana compuesto del fragmento hCF (SC20) del cromosoma 14 como se describe en el documento WO 02/43478. Los ratones HCo12-Balb/C pueden generarse cruzando HCo12 con KCo5 [J/K](Balb) como se describe en el documento WO /2009/097006.

Los esplenocitos de estos ratones transgénicos se pueden utilizar para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidos.

Además, los anticuerpos humanos de la presente divulgación o los anticuerpos de la presente divulgación de otras especies pueden identificarse mediante tecnologías tipo presentación, incluyendo sin limitación, fagos de presentación, retrovirus de presentación, presentación ribosómica, y otras técnicas, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica y las moléculas resultantes se pueden someter a maduración adicional, tal como maduración

de afinidad, como técnicas bien conocidas en la técnica (véase por ejemplo, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (fago de presentación), Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996) (fago de presentación), Hanes y Plutchau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997) (presentación ribosómica), Parmley y Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (fago de presentación), Scott TIBS 17, 241-245 (1992), Cwirla et al., PNAS USA 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 documento US 5.733.743). Si se utilizan tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no sean humanos, dichos anticuerpos se pueden humanizar.

Anticuerpos del grupo 1 de bloqueo cruzado

La presente divulgación proporciona un anticuerpo, que se une al mismo epítipo de HER2 que uno o más de los nuevos anticuerpos humanos del grupo 1 de bloqueo cruzado que se describe en el presente documento.

El anticuerpo puede bloquear de manera cruzada la unión al HER2 soluble del trastuzumab, cuando se determinaba como se describe en el Ejemplo 14.

El anticuerpo se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia 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 (**169**).

El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia 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 (**050**).

El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia 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: 84 (**084**).

El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia que comprende regiones VH y VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

- a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 77 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 78 (**049**);
- b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 79 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 80 (**051**);
- c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 82 (**055**);
- d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 83 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 84 (**123**);
- e) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 85 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 86 (**161**); y
- f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 87 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 88 (**124**).

El anticuerpo de la presente divulgación puede unirse a HER2 y comprende una secuencia de región CDR3 de VH, VH y/o una región VL similar o idéntica a una secuencia de los nuevos anticuerpos descritos en el presente documento.

El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región CDR3 de VH que tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en

- SEQ ID NO: 11 (**050, 049, 051, 055**), opcionalmente donde la región VH se deriva de la secuencia de la línea germinal IgHV3-21-1;
- SEQ ID NO: 130, tal como la secuencia de SEQ ID NO: 18 (**084**), opcionalmente donde la región VH se deriva de la secuencia de la línea germinal IgHV1-69-04;
- SEQ ID NO: 133 (**169, 123, 161, 124**), tal como la secuencia de SEQ ID NO: 4 (**169**), opcionalmente donde la región VH se deriva de la secuencia de la línea germinal IgHV1-18-1; o

El anticuerpo puede comprender una región CDR3 de VH de uno de los anticuerpos 123, 161, o 124, como se muestra en la Figura 1, opcionalmente donde la región VH se deriva de la línea germinal IgHV1-18-1.

El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región VH seleccionada de entre el grupo que consiste en

- a) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 9, 127 y 11, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ IND NO: 9, 10 y 11 (**050**); opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV3-23-1;

b) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 128, 129 y 130, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente (**084**), opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV1-69-04; y

5 c) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 131, 132 y 133, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ IND NO: 2, 3 y 4 (**169**), respectivamente, opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV1-18-1.

10 El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región VH seleccionada de entre las realizaciones precedentes (a) o (b) y una región VL que comprende la secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 13, XAS (donde X es A o V) y la SEQ ID NO: 155, respectivamente, tal como una secuencia de CDR1 seleccionada de entre las SEQ ID NO: 13 o 20, una CDR2 que es AAS o VAS, y una secuencia de CDR3 seleccionada de entre las SEQ ID NO: 14 y 21 (**050, 084**); respectivamente, opcionalmente donde la región VL se deriva de una línea germinal IgKV1-12-01.

15 El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región VH que es el punto precedente (c) y una región VL que comprende la secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 6, DXS (donde X es A o V) y la SEQ ID NO: 156 (**169**), respectivamente, opcionalmente donde la región VL se deriva de una línea germinal IgKV3-11-01.

20 En una realización de la invención, el anticuerpo comprende una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 2, 3 y 4, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 6, DAS y SEQ ID NO: 7, respectivamente (**169**).

25 El anticuerpo de la presente invención puede comprender una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 9, 10 y 11, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 13, AAS y SEQ ID NO: 14, respectivamente (**050**).

30 El anticuerpo de la presente invención puede comprender una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 20, VAS y SEQ ID NO: 21, respectivamente (**084**).

En diferentes divulgaciones, el anticuerpo comprende:

35 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 (**169**);

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: 12 (**050**);

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 (**084**);

40 d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 77 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 78 (**049**);

e) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 79 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 80 (**051**);

45 f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 82 (**055**);

g) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 83 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 84 (**123**);

h) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 85 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 86 (**161**);

50 i) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 87 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 88 (**124**); y/o

55 j) una variante de dichos anticuerpos, donde dicha variante tiene preferentemente al menos 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos, tal como sustituciones de aminoácidos conservadoras y sustituciones donde el nuevo aminoácido es el que está en la misma posición en una secuencia alineada de las Figuras 1 o 2, particularmente en las posiciones indicadas por "X" en la secuencia de consenso correspondiente.

En realizaciones particulares de la invención, el anticuerpo comprende:

60 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 (**169**);

b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 83 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 84 (**123**);

65 c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 85 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 86 (**161**); y/o

d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 87 y, preferentemente, una región VL que

comprende la secuencia de SEQ ID NO: 88 (124).

Anticuerpos del grupo 2 de bloqueo cruzado

5 La presente solicitud también desvela un anticuerpo, que se une al mismo epítipo de HER2 que uno o más de los nuevos anticuerpos humanos del grupo 2 de bloqueo cruzado que se describe en el presente documento.

El anticuerpo puede bloquear de manera cruzada la unión al HER2 soluble del pertuzumab, cuando se determinaba como se describe en el Ejemplo 14.

10 El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia 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 (**025**).

15 El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia 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: 32 (**091**).

20 El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 39 (**129**).

El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia que comprende regiones VH y VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

- 25
- a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 89 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 90 (**001**);
 - b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 91 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 92 (**143**);
 - 30 c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 93 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 94 (**019**);
 - d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 95 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 96 (**021**);
 - 35 e) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 97 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 98 (**027**);
 - f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 99 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 100 (**032**);
 - g) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 101 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 102 (**035**);
 - 40 h) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 103 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 104 (**036**);
 - i) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 105 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 106 (**054**); y
 - 45 j) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 107 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 108 (**094**).

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

50 El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región CDR3 de VH que tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en

- 55
- SEQ ID NO: 136, tal como la secuencia de SEQ ID NO: 25 (**025**), opcionalmente donde la región VH se deriva de la secuencia de la línea germinal IgHV4-34-1;
 - SEQ ID NO: 139, tal como la secuencia de SEQ ID NO: 31 (**091**), opcionalmente donde la región VH se deriva de la secuencia de la línea germinal IgHV4-34-01; y
 - SEQ ID NO: 142, tal como la secuencia de SEQ ID NO: 38 (**129**), opcionalmente donde la región VH se deriva de la secuencia de la línea germinal IgHV3-30-01.

60 El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región CDR3 de VH de uno de los anticuerpos 001, 143, 019, 021, 027, 032, 035, 036, 054 o 094 como se muestra en la Figura 1, opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV4-34-1.

65 El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región VH seleccionada de entre el grupo que consiste en

a) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 134, 135 y 136, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ IND NO: 23, 24 y 25 (**025**); opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV4-34-1;

b) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 137, 138 y 139, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 30, 163 y 31, respectivamente (**091**), opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV4-34-01; y

c) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 140, 141 y 142, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38 (**129**), respectivamente, opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV3-30-01.

El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región VH seleccionada de la realización precedente (a) y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 157, AAS, y SEQ ID NO: 164, respectivamente, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 27, AAS y la SEQ ID NO: 28 (**025**); respectivamente, opcionalmente donde la región VL se deriva de una línea germinal IgKV1D-16-01.

El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región VH seleccionada de la realización precedente (b) y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 33, AX₁X₂ (donde X₁ es A o T, preferentemente A; y X₂ es S o F, preferentemente S), y la SEQ ID NO: 158, respectivamente, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 33, AAS y la SEQ ID NO: 34 (**091**); respectivamente, opcionalmente donde la región VL se deriva de una línea germinal IgKV1D-16-01.

El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región VH que es el punto precedente (c) y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 40, DAS, y SEQ ID NO: 41 (**129**), respectivamente, opcionalmente donde la región VL se deriva de una línea germinal IgKV3-11-01.

El anticuerpo de la presente invención puede comprender una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 27, AAS y SEQ ID NO: 28, respectivamente (**025**).

El anticuerpo de la presente invención puede comprender una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 30, 163 y 31, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 33, AAS y SEQ ID NO: 34, respectivamente (**091**).

El anticuerpo de la presente invención puede comprender una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 40, DAS y SEQ ID NO: 41, respectivamente (**129**).

Por separado se desvela un anticuerpo, que comprende:

a) 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 (**025**);

b) 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: 32 (**091**);

c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 39 (**129**);

d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 89 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 90 (**001**);

e) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 91 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 92 (**143**);

f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 93 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 94 (**019**);

g) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 95 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 96 (**021**);

h) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 97 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 98 (**027**);

i) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 99 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 100 (**032**);

j) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 101 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 102 (**035**);

k) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 103 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 104 (**036**);

l) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 105 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 106 (**054**);

m) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 106 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 108 (**094**); y/o

n) una variante de dichos anticuerpos, donde dicha variante tiene preferentemente al menos 1, 2 o 3

modificaciones de aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos, tal como sustituciones de aminoácidos conservadoras y sustituciones donde el nuevo aminoácido es el que está en la misma posición en una secuencia alineada de las Figuras 1 o 2, particularmente en las posiciones indicadas por "X" en la secuencia de consenso correspondiente.

5

Anticuerpos del grupo 3 de bloqueo cruzado

La presente solicitud desvela adicionalmente un anticuerpo, que se une al mismo epítipo de HER2 que uno o más de los nuevos anticuerpos humanos del grupo 3 de bloqueo cruzado que se describe en el presente documento.

10

El anticuerpo puede bloquear de manera cruzada la unión al HER2 soluble de F5 y/o C5, cuando se determinaba como se describe en el Ejemplo 14.

15

El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 46 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49 (**127**).

20

El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia 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: 53 (**159**).

25

El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60 (**098**).

El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 63 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 67 (**153**).

30

El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 70 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 74 (**132**).

35

El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia que comprende regiones VH y VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

k) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 109 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 110 (**105**);

40

l) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 111 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 112 (**100**);

m) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 113 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 114 (**125**);

45

n) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 115 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 116 (**162**);

o) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 117 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 118 (**033**);

p) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 119 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 120 (**160**);

50

q) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 121 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 122 (**166**);

r) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 123 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 124 (**152**); y

s) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 125 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 126 (**167**).

55

El anticuerpo de la presente divulgación puede unirse a HER2 y comprende una secuencia de región CDR3 de VH, VH y/o una región VL similar o idéntica a una secuencia de los nuevos anticuerpos descritos en el presente documento.

60

El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región CDR3 de VH que tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en

SEQ ID NO: 148, tal como la secuencia de SEQ ID NO: 48 (**127**), opcionalmente donde la región VH se deriva de la secuencia de la línea germinal IgHV5-51-01;

65

SEQ ID NO: 52 (**159**), opcionalmente donde la región VH se deriva de la secuencia de la línea germinal IgHV5-51-01;

SEQ ID NO: 145, tal como la secuencia de SEQ ID NO: 59 (**098**), opcionalmente donde la región VH se deriva de la secuencia de la línea germinal IgHV3-23-01;

SEQ ID NO: 154, tal como la secuencia de SEQ ID NO: 66 (**153**), opcionalmente donde la región VH se deriva de la secuencia de la línea germinal IgHV3-30-03-01; y

5 SEQ ID NO: 151, tal como la secuencia de SEQ ID NO: 73 (**132**), opcionalmente donde la región VH se deriva de la secuencia de la línea germinal IgHV1-18-01.

10 El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región CDR3 de VH de uno de los anticuerpos 105, 100, 125 o 162, como se muestra en la Figura 1, opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV3-23-1.

15 El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región CDR3 de VH de uno de los anticuerpos 033, 160, 166, 152 o 167, como se muestra en la Figura 1, opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV3-30-3-01.

El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región VH seleccionada de entre el grupo que consiste en

20 a) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 146, 147 y 148, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ IND NO: 43, 44 y 45 (**127**); opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV5-51-01;

b) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 149, 51 y 52, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 50, 51 y 52, respectivamente (**159**), opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV5-51-01;

25 c) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 143, 144 y 145, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 57, 58 y 59 (**098**), respectivamente, opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV3-23-01;

30 d) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 152, 153 y 154, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 64, 65 y 66, respectivamente (**153**), opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV3-30-03-01; y

e) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 71, 150 y 151, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ IND NO: 71, 72 y 73 (**132**), respectivamente, opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV1-18-01.

35 El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región VH seleccionada de la realización precedente (a) y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 47, AAS y SEQ ID NO: 48 (**127**); respectivamente, opcionalmente donde la región VL se deriva de una línea germinal IgKV1D-8-01.

40 El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región VH seleccionada de la realización precedente (b) y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 54, AAS, y SEQ ID NO: 55 (**159**); respectivamente, opcionalmente donde la región VL se deriva de una línea germinal IgKV1D-16-01.

45 El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región VH que es la realización precedente (c) y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 159, AAS y SEQ ID NO: 160, respectivamente, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de VL de las SEQ ID NO: 61, AAS y SEQ ID NO: 62 (**098**), opcionalmente donde la región VL se deriva de IgKV1D-16-01.

50 El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región VH que es la realización precedente (d) y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 161, XAS (donde X = D o A, preferentemente D), y la SEQ ID NO: 162 (**153**), tal como las secuencias de CDR de VL de SEQ ID NO: 68, DAS, y 69, opcionalmente donde la región VL se deriva de IgKV1D-16-01.

55 El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una región VH que es la realización precedente (e) y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 75, DAS, y SEQ ID NO: 76 (**132**), respectivamente, opcionalmente donde la región VL se deriva de una línea germinal IgKV3-11-01.

60 El anticuerpo de la presente invención puede comprender una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 43, 44 y 45, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 47, AAS y SEQ ID NO: 48, respectivamente (**127**).

El anticuerpo de la presente invención puede comprender una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 50, 51 y 52, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 54, AAS y SEQ ID NO: 55, respectivamente (**159**).

65 El anticuerpo de la presente invención puede comprender una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 57, 58 y 59, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias de

CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 60, AAS y SEQ ID NO: 61, respectivamente (**098**).

5 El anticuerpo de la presente invención puede comprender una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 64, 65 y 66, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 68, DAS y SEQ ID NO: 69, respectivamente (**153**).

10 El anticuerpo de la presente invención puede comprender una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 71, 72 y 73, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 75, DAS y SEQ ID NO: 76, respectivamente (**132**).

El anticuerpo de la presente divulgación puede comprender:

- a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 46 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49 (**127**);
- 15 b) 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: 53 (**159**);
- c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60 (**098**);
- 20 d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 63 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 67 (**153**);
- e) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 70 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 74 (**132**);
- f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 109 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 110 (**105**);
- 25 g) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 111 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 112 (**100**);
- h) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 113 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 114 (**125**);
- 30 i) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 115 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 116 (**162**);
- j) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 117 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 118 (**033**);
- k) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 119 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 120 (**160**);
- 35 l) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 121 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 122 (**166**);
- m) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 123 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 124 (**152**);
- 40 o) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 125 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 126 (**167**); y/o
- 45 p) una variante de dichos anticuerpos, donde dicha variante tiene preferentemente al menos 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos, tal como sustituciones de aminoácidos conservadoras y sustituciones donde el nuevo aminoácido es el que está en la misma posición en una secuencia alineada de las Figuras 1 o 2, particularmente en las posiciones indicadas por "X" en la secuencia de consenso correspondiente.

Anticuerpos biespecíficos

50 El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico, que comprende (i) un primer anticuerpo que comprende una región de unión al antígeno de un anticuerpo como se define en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo de bloqueo cruzado 1, 2 o 3, o la región VH y VL que comprende las secuencias de (**005**), y (ii) un segundo anticuerpo que comprende una región de unión al antígeno de un anticuerpo que se une a CD3.

55 El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico, que comprende (i) un primer anticuerpo que comprende una región de unión al antígeno de un anticuerpo como se define en el presente documento o las regiones VH y VL que comprenden las secuencias de (**005**), y (ii) un segundo anticuerpo que comprende una región de unión al antígeno de un anticuerpo como se define en el presente documento o las regiones VH y VL que comprenden las secuencias de (**005**), donde la primera región de unión al antígeno se une a un epítipo diferente que la segunda región de unión al antígeno.

60

El primer anticuerpo puede comprender una región VH que comprende una secuencia de CDR3 de un anticuerpo del bloqueo cruzado 1, 2 o 3 como se define en el presente documento, tal como la SEQ ID NO: 4, 25 o 66 (**169**, **025** o **153**), o una secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 168 (**005**).

65

5 El primer anticuerpo puede comprender una región VH que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo del bloqueo cruzado 1, 2 o 3 como se define en el presente documento, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 2, 3 y 4 (**169**), o las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 23, 24 y 25 (**025**), o las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ IND NO: 64, 65 y 66 (**153**) o las secuencias de CDR1, CDR2, CDR3 de las SEQ ID NO: 166, 167 y 168 (**005**).

10 El primer anticuerpo puede comprender una región VH que comprende una secuencia de CDR3 de un anticuerpo del bloqueo cruzado 1, 2 o 3 como se define en el presente documento, tal como la secuencia de CDR3 de un anticuerpo del bloqueo cruzado 1 de SEQ ID NO: 11, (**050**), o SEQ ID NO: 18 (**084**); o una secuencia de CDR3 de un anticuerpo de bloqueo cruzado 2 de SEQ ID NO: 31, (**091**), o SEQ ID NO: 38 (**129**); o una secuencia de CDR3 de un anticuerpo de bloqueo cruzado 3 de SEQ ID NO: 45, (**127**), o SEQ ID NO: 52, (**159**), o SEQ ID NO: 59, (**098**), o SEQ ID NO: 73 (**132**).

15 El primer anticuerpo puede comprender una región VH que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo del bloqueo cruzado 1, 2 o 3 como se define en el presente documento, tales como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 2, 3 y 4 (**169**), o las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 23, 24 y 25 (**025**), o las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ IND NO: 64, 65 y 66 (**153**) o las secuencias de CDR1, CDR2, CDR3 de las SEQ ID NO: 166, 167 y 168 (**005**).

20 El primer anticuerpo puede comprender una región VH que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo del bloqueo cruzado 1, 2 o 3 como se define en el presente documento una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo de bloqueo cruzado 1, 2, o 3 como se define en el presente documento.

25 El primer anticuerpo puede comprender una región VH que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo del bloqueo cruzado 1, 2 o 3 como se define en el presente documento, tales como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo de cloqueo cruzado 1 de las SEQ ID NO: 9, 10 y 11 (**050**), o SEQ ID NO: 16, 17 y 18 (**084**); o las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo de bloqueo cruzado 2 de las SEQ ID NO: 30, 163 y 31 (**091**), o SEQ ID NO: 36, 37 y 38 (**129**); o las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo de bloqueo cruzado 3 de las SEQ ID NO: 43, 44 y 45 (**127**), o las SEQ ID NO: 50, 51 y 52 (**159**), o las SEQ ID NO: 57, 58 y 59 (**098**), o las SEQ ID NO: 71, 72 y 73 (**132**).

35 El primer anticuerpo puede comprender una región VH y una región VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

- a) una región VH que comprende la secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 2, 3 y 4; y una región VL que comprende la secuencias de CDR1 CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 6, GAS y SEQ ID NO: 7, respectivamente (**169**);
- 40 b) una región VH que comprende la secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 23, 24 y 25; y una región VL que comprende la secuencias de CDR1 CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 27, AAS y SEQ ID NO: 28, respectivamente (**025**);
- c) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 64, 65 y 66; y una región VL que comprende la secuencias de CDR1 CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 68, DAS, y SEQ ID NO: 69 (**153**); y
- 45 d) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 166, 167 y 168; y una región VL que comprende la secuencias de CDR1 CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 169, GAS y SEQ ID NO: 170 (**005**).

50 El primer anticuerpo puede comprender una región VH y una región VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

- a) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 9, 127 y 11, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ IND NO: 9, 10 y 11 (**050**); opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV3-23-1;
- 55 b) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 128, 129 y 130, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente (**084**), opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV1-69-04; y
- c) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 137, 138 y 139, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 30, 163 y 31, respectivamente (**091**), opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV4-34-01; y
- 60 d) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 140, 141 y 142, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ IND NO: 36, 37 y 38 (**129**), respectivamente, opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV3-30-01.
- 65 e) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 146, 147 y 148, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ IND NO: 43, 44 y 45 (**127**); opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV5-51-01;

f) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 149, 51 y 52, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 50, 51 y 52, respectivamente (**159**), opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV5-51-01;

g) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 143, 144 y 145, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ IND NO: 57, 58 y 59 (**098**), respectivamente, opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV3-23-01;

h) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 71, 150 y 151, tal como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ IND NO: 71, 72 y 73 (**132**), respectivamente, opcionalmente donde la región VH se deriva de una línea germinal IgHV1-18-01.

El segundo anticuerpo puede ser uno de las divulgaciones previas descritas para el primer anticuerpo, pero donde el segundo anticuerpo se une a un epítoto diferente que el primer anticuerpo.

El segundo anticuerpo puede ser un anticuerpo CD3. En una realización un anticuerpo CD3 puede ser un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 171 (**YTH12.5**) y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 172 (**YTH12.5**). Otro ejemplo de un anticuerpo CD3 es un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 173 (**huCLB-T3/4**) y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 174 (**huCLB-T3/4**).

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico, que comprende (i) un primer anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias VH y VL, cuyo anticuerpo comprende las secuencias de las regiones VH y VL de (**005**), (**025**), (**153**) o (**169**), y cuyo anticuerpo comprende una región Fc de IgG1 de tipo silvestre, donde la región CH3 contiene Ile en la posición 350, una Thr en la posición 370, y una Leu en la posición 405 y (ii) un segundo anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, cuyo anticuerpo comprende las secuencias de regiones VH y VL de (**005**), (**025**), (**153**) o (**169**), y cuyo anticuerpo comprende una región Fc de IgG1 de tipo silvestre, donde la región CH3 contiene una Arg en la posición 409. Se proporcionan divulgaciones específicas en los ejemplos.

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico, que comprende (i) un primer anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 164 y una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 165 (**005**), opcionalmente donde el primer anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1, donde la región CH3 contiene Ile en la posición 350, una Thr en la posición 370, y una Leu en la posición 405; y (ii) un segundo anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (**169**), opcionalmente donde el segundo anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1 que tiene una Arg en la posición 409.

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico, que comprende (i) un primer anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 (**025**), opcionalmente donde el primer anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1, donde la región CH3 contiene Ile en la posición 350, una Thr en la posición 370, y una Leu en la posición 405; y (ii) un segundo anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 164 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 165 (**005**), opcionalmente donde el segundo anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1 que tiene una Arg en la posición 409.

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico, que comprende (i) un primer anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 (**025**), opcionalmente donde el primer anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1, donde la región CH3 contiene Ile en la posición 350, una Thr en la posición 370, y una Leu en la posición 405; y (ii) un segundo anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 (**153**), opcionalmente donde el segundo anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1 que tiene una Arg en la posición 409.

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico, que comprende (i) un primer anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 (**025**), opcionalmente donde el primer anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1, donde la región CH3 contiene Ile en la posición 350, una Thr en la posición 370, y una Leu en la posición 405; y (ii) un segundo anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (**169**), opcionalmente donde el segundo anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1 que tiene una Arg en la posición 409.

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico, que comprende (i) un primer anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 63 y una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 (**153**), opcionalmente donde el primer anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1, donde la región CH3 contiene lle en la posición 350, una Thr en la posición 370, y una Leu en la posición 405; y (ii) un segundo anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 164 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 165 (**005**), opcionalmente donde el segundo anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1 que tiene una Arg en la posición 409.

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico, que comprende (i) un primer anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 y una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 (**153**), opcionalmente donde el primer anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1, donde la región CH3 contiene lle en la posición 350, una Thr en la posición 370, y una Leu en la posición 405; y (ii) un segundo anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (**169**), opcionalmente donde el segundo anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1 que tiene una Arg en la posición 409.

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico, que comprende (i) un primer anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 y una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 (**153**), opcionalmente donde el primer anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1, que tiene Arg en la posición 409, o Gln en la posición 297, o una Arg en la posición 409 y Gln en la posición 297; y (ii) un segundo anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172 (YTH12.5), opcionalmente donde el segundo anticuerpo comprende una región Fc κ de IgG1 que tiene Gln en la posición 297, o Leu en la posición 405, o Gln en la posición 297 y Leu en la posición 405.

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico, que comprende (i) un primer anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (**169**), opcionalmente donde el primer anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1, que tiene Arg en la posición 409; y (ii) un segundo anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172 (YTH12.5), opcionalmente donde el segundo anticuerpo comprende una región Fc κ de IgG1 que tiene Gln en la posición 297, o Leu en la posición 405, o Gln en la posición 297 y Leu en la posición 405.

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico, que comprende (i) un primer anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 y una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 (**153**), opcionalmente donde el primer anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1, que tiene Arg en la posición 409, o Gln en la posición 297, o una Arg en la posición 409 y Gln en la posición 297; y (ii) un segundo anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174 (huCLB-T3/4), opcionalmente donde el segundo anticuerpo comprende una región Fc κ de IgG1 que tiene una Gln en la posición 297, o Leu en la posición 405, o Gln en la posición 297 y Leu en la posición 405.

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico, que comprende (i) un primer anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (**169**), opcionalmente donde el primer anticuerpo comprende una región Fc κ , de IgG1, que tiene Arg en la posición 409; y (ii) un segundo anticuerpo que tiene una región Fc y secuencias de VH y VL, donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174 (huCLB-T3/4), opcionalmente donde el segundo anticuerpo comprende una región Fc κ de IgG1 que tiene una Gln en la posición 297, o Leu en la posición 405, o Gln en la posición 297 y Leu en la posición 405.

Un anticuerpo CD3 es un anticuerpo con una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 171 (VH YTH12.5) y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 172 (VL YTH12.5). Otro ejemplo es un anticuerpo CD3 con una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 173 (VH huCLB-T3/4) y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 174 (VL huCLB-T3/4).

Un anticuerpo biespecífico de la presente divulgación puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en: IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R, IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R, IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R, IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R, IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R; y IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R, donde la IgG1-005-ITL significa **005** IgG1, κ que tiene lle en la posición 350, Thr en la posición 370, y Leu en la posición 405, IgG1-005-K409R significa **005** IgG1, κ que tiene una Arg en la posición 409, IgG1-025-ITL significa **025** IgG1, κ que tiene lle en la posición 350, Thr en la posición 370, y Leu en la posición 405, IgG1-153-ITL significa **153** IgG1, κ que contiene lle en la posición 350, Thr en la posición 370, y Leu en la posición 405, IgG1-153-K409R significa **153** IgG1, κ que tiene

una Arg en la posición 409, IgG1-169-K409R significa **169** IgG1, κ que tiene una Arg en la posición 409, y donde los números en negrita se refieren a anticuerpos descritos en el presente documento con las regiones VH y VL que comprenden las secuencias descritas en la Tabla 1 y por **005** en el Ejemplo 21; es decir, las SEQ ID NO: 164 y 165.

5 El anticuerpo biespecífico de la presente divulgación puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en: IgG1-HER2-153-K409R x IgG1-YTH12.5-F405L, IgG1-HER2-153-K409R x IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L, IgG1-HER2-153-K409R x IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L, IgG1-HER2-153-K409R x IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L, IgG1-HER2-153-N297Q-K409R x IgG1-YTH12.5-F405L, IgG1-HER2-153-N297Q-K409R x IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L, IgG1-HER2-153-N297Q-K409R x IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L, IgG1-HER2-153-N297Q-K409R x IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L, IgG1-HER2-169-K409R x IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L, IgG1-HER2-169-K409R x IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L, IgG1-HER2-169-K409R x IgG1-YTH12.5-F405L y IgG1-HER2-169-K409R x IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L.

Propiedades funcionales de anticuerpos y anticuerpos biespecíficos del grupo 1, 2, y 3

15 El anticuerpo de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo de HER2 que uno o más de los nuevos anticuerpos del Grupo 1, 2 o 3 descritos en el presente documento, preferentemente cuando se determinan como se describe en el Ejemplo 14; y se caracteriza adicionalmente por una o más propiedades determinadas como se describe en los Ejemplos 12, 13, 15, 16, 17, 18 y 19.

20 En una realización de la invención, el anticuerpo HER2 tiene un valor de CE₅₀ menor (mitad de la concentración eficaz máxima) que el trastuzumab en la unión a células A431, preferentemente un valor de CE₅₀ menor de 0,80 µg/ml o 0,50 µg/ml, cuando se determinan como se describe en el Ejemplo 12.

25 El anticuerpo HER2 de la presente divulgación puede tener un valor de CE₅₀ (mitad de la concentración efectiva máxima) que el trastuzumab en la unión a las células A431, preferentemente un valor CE₅₀ menor de 0,80 µg/ml o 0,50 µg/ml, o 0,30 µg/ml, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 12, y puede unirse preferentemente al mismo epítipo que al menos un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en

- 30 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 (**169**);
 b) 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 (**084**);
 35 c) 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 (**025**);
 d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 32 (**091**);
 40 e) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 46 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49 (**127**);
 f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 53 (**159**);
 g) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60 (**098**);
 45 h) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 63 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 67 (**153**); y
 i) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 70 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 74 (**132**).

50 El anticuerpo anti-HER2 de la presente divulgación puede unirse específicamente a células epiteliales de Rhesus positivas a HER2, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 13, y puede unirse preferentemente al mismo epítipo que al menos un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en las regiones VH y VL de cualquiera de los anticuerpos 169, 050, 084, 025, 091, 129, 127, 159, 098, 153 y 132.

55 En una realización adicional o alternativa, el anticuerpo anti-HER2 induce eficazmente una ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo), preferentemente alcanzando una liberación específica de Cr⁵¹ de al menos un 30 %, más preferentemente de al menos un 40 % cuando se determina como se describe en el Ejemplo 15.

60 El anticuerpo anti-HER2 de la presente divulgación puede inducir ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo) eficazmente, preferentemente alcanzando una liberación específica de Cr⁵¹ de al menos un 30 %, más específicamente de al menos un 40 %, cuando se determina en el Ejemplo 15, y puede unirse preferentemente al mismo epítipo que al menos un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

65

- 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 (**169**);
- 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: 12 (**050**);
- 5 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 (**084**);
- 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 (**025**);
- 10 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: 32 (**091**);
- f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 39 (**129**); y
- g) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 63 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 67 (**153**).

15 En una realización adicional o alternativa, el anticuerpo HER2 se une específicamente a células AU565 que expresan HER2, pero promueve la proliferación independiente de ligando de las células menos que cualquiera de F5 y C1 cuando se determina como se describe en el Ejemplo 16.

20 El anticuerpo HER2 puede unirse específicamente a células AU565 que expresan HER2, pero promueve la proliferación independiente de ligando de las células menos que cualquiera de F5 y C1 cuando se determina como se describe en el Ejemplo 16, y puede unirse preferentemente al mismo epítipo que al menos un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de entre el 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 (**169**);
- 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: 12 (**050**);
- 30 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 (**084**);
- 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 (**025**);
- 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: 32 (**091**);
- 35 f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 39 (**129**);
- g) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 46 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49 (**127**);
- h) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 53 (**159**);
- 40 i) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60 (**098**);
- j) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 63 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 67 (**153**); y
- 45 k) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 70 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 74 (**132**).

50 En una realización adicional o alternativa, el anticuerpo HER2 se une específicamente a células AU565 que expresan HER2, pero promueve la proliferación independiente de ligando de las células menos que cualquiera de F5 y C1 cuando se determina como se describe en el Ejemplo 16.

El anticuerpo HER2 de la presente divulgación puede unirse específicamente a células AU565 que expresan HER2 e inhibe la proliferación independiente de ligando de las células, preferentemente inhibiendo la proliferación al menos un 20 %, más preferentemente al menos un 25 % cuando se determina como se describe en el Ejemplo 16, y puede unirse preferentemente al mismo epítipo que al menos un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de entre el 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 (**169**); y
- 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: 12 (**050**).

65 En una realización adicional o alternativa, el anticuerpo HER2 se une específicamente a células AU565 que expresan HER2 pero no promueve la proliferación inducida por ligando de las células cuando se determina como se describe en el Ejemplo 17, y se une al mismo epítipo que al menos un anticuerpo de referencia 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 (**169**).

El anticuerpo HER2 de la presente divulgación puede unirse específicamente a células AU565 que expresan HER2 pero puede no tener un efecto significativo, o puede no promover, la proliferación inducida por ligando de las células, preferentemente inhibiendo la proliferación no más de un 25 %, más preferentemente no más de un 15 % cuando se determina como se describe en el Ejemplo 17, y puede unirse al mismo epítipo que al menos un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de entre el 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 (**169**);
- 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: 12 (**050**);
- 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 (**084**); y
- d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60 (**098**).

El anticuerpo HER2 de la presente divulgación puede unirse específicamente a células MCF-7 que expresan HER2 e inhibe la proliferación dependiente de ligando de las células, por ejemplo, puede inhibir completamente el efecto inducido por ligando o inhibir la proliferación total sobre un 50 %, por ejemplo, un 60 % o un 70 % o un 80 % de las células cuando se determina como se describe en el Ejemplo 17, y puede unirse preferentemente al mismo epítipo que al menos un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

- a) 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 (**025**);
- b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 32 (**091**);
- c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 39 (**129**); y
- d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 63 y, preferentemente, una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 67 (**153**).

En una realización adicional o alternativa, el anticuerpo, cuando se conjuga directa o indirectamente con un resto terapéutico tal como una forma truncada de exotoxina A de pseudomonas, es más eficaz que el trastuzumab a la hora de destruir las células AU565, las células A431, o ambas células AU565 y A431, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 18. El anticuerpo conjugado de la presente divulgación puede tener un valor de CE₅₀ de menos de 70 ng/ml, menos de 50 ng/ml, o menos de 30 ng/ml en la destrucción de las células AU565 y/o las células A431, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 18, y se puede unir al mismo epítipo que al menos un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL de un anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste en 169, 091, 050, 084, 098, 05, 153, 129, 132, 127 y 159; preferentemente seleccionado de entre los anticuerpos 153, 129, 098, 091 y 025.

El anticuerpo conjugado de la presente divulgación puede tener o puede resultar en un porcentaje más alto de células AU565 destruidas que el trastuzumab y el pertuzumab cuando se determina como se describe en el Ejemplo 18, eliminando preferentemente al menos un 49 %, más preferentemente al menos un 60 % de las células AU565, y se puede unir al mismo epítipo que al menos un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL de un anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste en 169, 091, 050, 084, 098, 025, 153, 129, 132, 127 y 159; preferentemente seleccionado de entre los anticuerpos 153, 132, 127, 129, 159 y 025.

El anticuerpo conjugado de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia 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: 53 (**159**).

El anticuerpo conjugado de la presente divulgación puede tener un porcentaje más alto de células AU431 destruidas que el trastuzumab y el pertuzumab cuando se determina como se describe en el Ejemplo 18, eliminando preferentemente al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 70 % y se puede unir al mismo epítipo que al menos un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL de un anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste en 025, 084, 091, 098, 129 y 153; preferentemente seleccionado de entre los anticuerpos 025, 091, 098, 129 y 153.

El anticuerpo conjugado de la presente divulgación se puede unir al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60 (**098**).

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser internalizado por células tumorales que expresan HER2, tales como las células AU565, con un grado mayor que el trastuzumab y el pertuzumab, preferentemente más de dos o tres veces la cantidad de trastuzumab internalizado, preferentemente cuando se determina de acuerdo con el ejemplo 18, y puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

- a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 46 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49 (**127**);
- b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 53 (**159**);
- c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60 (**098**);
- d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 63 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 67 (**153**); y
- e) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 70 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 74 (**132**).

Preferentemente, el anticuerpo de la presente divulgación se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de entre

- a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 46 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49 (**127**); y
- b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60 (**098**).

El anticuerpo de la presente divulgación puede unirse al Dominio II o IV de HER2, preferentemente cuando el anticuerpo no promueve significativamente la proliferación de células que expresan HER2, y se internaliza más eficazmente, o se internaliza con un grado mayor, que el trastuzumab o el pertuzumab en las células tumorales que expresan HER2, preferentemente cuando se determina como se describe en los Ejemplos, por ejemplo, los ejemplos 16 y 19, respectivamente.

El anticuerpo de la presente divulgación puede aumentar la regulación negativa de HER2 más que el trastuzumab, por ejemplo, el anticuerpo puede aumentar la regulación negativa de HER2 en más del 30 %, tal como más del 40 % o más del 50 % cuando se determina como se describe en el Ejemplo 22, preferentemente cuando el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo del grupo 3 de bloqueo cruzado de la presente invención, por ejemplo, un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

- a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60 (**098**);
- b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 63 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 67 (**153**).

El anticuerpo de la presente divulgación puede disminuir el crecimiento tumoral y mejorar la supervivencia *in vivo* más que el trastuzumab, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 29, preferentemente cuando el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo de bloqueo cruzado 1 o bloqueo cruzado 2 de la presente invención, por ejemplo, un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de entre el 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 (**169**);
- b) 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 (**084**); y
- c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 32 (**091**).

El anticuerpo de la presente divulgación puede disminuir el crecimiento tumoral y mejorar la supervivencia *in vivo* más que el trastuzumab, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 30, preferentemente cuando el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo de bloqueo cruzado 2 o bloqueo cruzado 3 de la presente invención, por ejemplo, un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

- a) 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 (**025**);
- b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 32 (**091**);

- c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 39 (**129**); y
 d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 63 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 67 (**153**).

5 Más particularmente, cuando el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia que comprende las regiones VH y VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

- 10 a) 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 (**025**); y
 b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 32 (**091**).

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

15 El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo biespecífico que aumenta la regulación negativa de HER2, en particular más que sus equivalentes mono-específicos, por ejemplo, el anticuerpo aumenta la regulación negativa de HER2 más de un 20 %, tal como más de un 30 %, o más de un 40 % cuando se determina como se describe en el Ejemplo 22, preferentemente cuando el anticuerpo se une a los mismos epítipos que un anticuerpo biespecífico seleccionado de entre el grupo que consiste en IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R, IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R, IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R, IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R, IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R; y IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R.

25 El anticuerpo biespecífico de la presente invención puede unirse específicamente a células AU565 que expresan HER2 e inhibir la proliferación de las células cuando se determina como se describe en el Ejemplo 24, y se une a los mismos epítipos que al menos un anticuerpo biespecífico seleccionado de entre el grupo que consiste en: IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R, IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R, IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R, IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R, IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R; y IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R. En particular el anticuerpo biespecífico puede inhibir la proliferación de las células AU565 más que sus equivalentes mono-específicos y se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R y IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R.

35 El anticuerpo biespecífico puede ser un anticuerpo biespecífico HER2 x CD3 que induce una citotoxicidad mediada por células T de las AU565 como se describe en el Ejemplo 25, y se une a los mismos epítipos que al menos uno de los anticuerpos biespecíficos seleccionados de entre el grupo que consiste en: Dúo huCLB-Q/153-Q, Dúo huCLB-Q/B12-Q, Dúo YTH12.5/153-Q y Dúo YTH12.5/B12-Q (indicando Dúo el anticuerpo biespecífico).

Formatos de anticuerpo

40 La presente solicitud desvela anticuerpos HER2 que se unen eficazmente y se internalizan en células tumorales que expresan HER2, normalmente sin promover significativamente la proliferación independiente de ligando de las células. Dependiendo de las propiedades funcionales deseadas para un uso particular, los anticuerpos se pueden seleccionar de entre el conjunto de anticuerpos proporcionados en la presente divulgación y/o se puede adaptar su formato para cambiar estas propiedades, como se describe a continuación.

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

55 El anticuerpo de la presente divulgación puede estar glicomodificado para reducir la fucosa y de esta manera aumentar la ADCC, por ejemplo, por adición de compuestos al medio de cultivo durante la producción del anticuerpo como se describe en el documento ADCC o como se describe en Berkel et al. (2010) Biotechnol. Bioeng. 105:350 o utilizando células FUT8 inactivadas, por ejemplo, como se describe en Yamane-Ohnuki et al (2004) Biotechnol. Bioeng 87:614. La ADCC se puede optimizar de manera alternativa utilizando el método descrito por Umaña et al. (1999) Nature Biotech 17:176.

60 El anticuerpo de la presente divulgación puede haberse modificado para aumentar la activación del complemento, por ejemplo, como se describe en Natsume et al. (2009) Cancer Sci. 100:2411.

65

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de longitud completa, preferentemente un anticuerpo IgG1, en particular un anticuerpo IgG1, κ . En otra realización, el anticuerpo de la invención es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla.

5 Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener, por ejemplo, por fragmentación utilizando técnicas convencionales, y explorar los fragmentos en cuanto a su utilidad de la misma manera que se describe en el presente documento para los anticuerpos completos. Por ejemplo, los fragmentos $F(ab')_2$ se pueden generar tratando un anticuerpo con tripsina. 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
10 tratando un anticuerpo con papaína. Un fragmento $F(ab')_2$ también se puede producir uniendo fragmentos Fab' mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpo también se pueden generar por 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 de la bisagra de la
15 cadena H, seguido por un codón de parada de la traducción para dar lugar a dicha molécula de fragmento de anticuerpo truncada.

Como se ha explicado anteriormente, el anticuerpo HER2 de la presente divulgación puede ser un anticuerpo bivalente, es decir, un anticuerpo capaz de unirse a dos antígenos o epítopos del mismo antígeno.

20 El anticuerpo HER2 de la presente divulgación puede ser un anticuerpo monovalente.

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un fragmento Fab o un anticuerpo de un brazo, tal como se describe en el documento US20080063641 (Genentech) u otro anticuerpo monovalente, tal como el que se describe en el documento WO 2007048037 (Amgen).

Un anticuerpo monovalente puede tener una estructura como la descrita en el documento WO 2007059782 (Genmab) (incorporado en el presente documento por referencia) que tiene una eliminación en la región bisagra. En consecuencia, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monovalente, donde dicho anticuerpo HER2 se construye por
30 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
35 constante CL de una Ig, donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo específico de un antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CL de una Ig están unidas operativamente, y donde, en el caso de un subtipo IgG1, la secuencia de nucleótidos que codifica la región CL se ha modificado de manera que la región CL no contiene aminoácidos capaces de formar enlaces disulfuro o enlaces covalentes con otros péptidos que comprendan una secuencia de aminoácidos idéntica a la
40 región CL en presencia de una IgG policlonal humana o cuando se administra a un animal o un 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 una región VH de un anticuerpo específico del antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante
45 CH de una Ig humana, donde la secuencia de nucleótidos que codifica la región CH se ha modificado de manera que la región correspondiente con la región bisagra, y, si es necesario para el subtipo de Ig, otras regiones de la región CH, tal como la región CH3, no comprende ningún resto de aminoácido que participe en la formación de enlaces disulfuro o covalentes o enlaces entre cadenas pesadas no covalentes estables con otros péptidos que comprendan una secuencia de aminoácidos idéntica con la región CH de la Ig humana en presencia de una IgG humana policlonal o cuando se administra a un animal o ser humano, donde dicha secuencia de nucleótidos que
50 codifica la región VH de un anticuerpo específico de un antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CH de dicha Ig están unidas operativamente;

iii) proporcionar un sistema de expresión celular para producir dicho anticuerpo monovalente;

iv) producir dicho anticuerpo monovalente coexpresando las construcciones de ácido nucleico de (i) y (ii) en células del sistema de expresión celular de (iii).

55 De manera similar, el anticuerpo HER2 de la presente divulgación puede ser un anticuerpo monovalente, que comprende

(i) una región variable de un anticuerpo de la invención como se ha descrito en el presente documento o una parte de unión al 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} , donde la región C_H o fragmento de la misma se ha modificado de manera que la región correspondiente con la región bisagra y, si la inmunoglobulina no es del subtipo IgG4, otras regiones de la región C_H , tales como la región C_{H3} , no comprenden ningún resto de aminoácidos, que sea capaz de formar enlaces disulfuro con una
65 región C_H idéntica u otros enlaces entre cadenas pesadas no covalentes estables con una región C_H idéntica en presencia de la IgG humana policlonal.

La cadena pesada del anticuerpo HER2 monovalente de la presente divulgación puede haberse modificado de manera que se haya eliminado la bisagra completa.

La inmunoglobulina a la que se hace referencia en la etapa ii) anterior puede ser del subtipo IgG4.

Dicho anticuerpo monovalente puede ser del subtipo IgG4, pero la región C_H3 puede haberse modificado de manera que se hayan hecho una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos:

Numeración de las mutaciones de CH3

KABAT*	Índice EU G4*	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 F405A o F405L o F405T o F405D o F405R o F405Q o F405K o F405Y
F436	F405	Y407A o Y407E o Y407Q o Y407K o Y407F
Y438	Y407	(F405T e Y407E) o (F405D e Y407E)
F436 e Y438	F405 e Y407	(D399S e Y407Q) o (D399S e Y407K) o (D399S e Y407E)
D427 e Y438	D399 e Y407	

*KABAT indica la numeración de aminoácidos según Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Índice EU indica la numeración de aminoácidos según el índice EU como se expone en Kabat et al., (supra).

La secuencia de dicho anticuerpo monovalente puede haberse modificado de manera que no comprenda ningún sitio receptor para la glicosilación unida a N.

Los anticuerpos HER2 de la presente divulgación también incluye anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla son péptidos en los que las regiones Fv de la cadena pesada y la cadena ligera están conectadas. La presente divulgación proporciona un Fv de cadena sencilla (scFv) donde las cadenas pesada y ligera del Fv de un anticuerpo HER2 de la presente divulgación están unidas con un enlazador peptídico flexible (normalmente de aproximadamente 10, 12, 15 o más restos de aminoácido) en una cadena peptídica sencilla. Los métodos de producción de dichos anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento US 4.946.778, Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Bird et al., Science 242, 423-426 (1988), Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) y McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990). El anticuerpo de cadena sencilla puede ser monovalente, si solo se utiliza una única 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.

El anticuerpo HER2 de la presente divulgación puede ser un anticuerpo deficiente en función efectora. El anticuerpo HER2 deficiente en función efectora puede ser un anticuerpo IgG4 humano estabilizado, que se ha modificado para evitar el intercambio de brazo de Fab (van der Neut Kofschoten et al. (2007) Science 317(5844): 1554-7). Ejemplos de anticuerpos IgG4 humanos estabilizados adecuados son anticuerpos, donde la arginina en la posición 409 de una región constante de cadena pesada de la IgG4 humana, que se indica en el índice EU como en Kabat et al, está sustituida por una lisina, treonina, metionina, o leucina, preferentemente lisina (descrito en el documento WO 2006033386 (Kirin)) y/o donde la región bisagra se ha modificado para que comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys.

El anticuerpo HER2 IgG4 estabilizado puede ser un anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde dicha cadena pesada comprende una región constante de IgG4 humana que tiene un resto seleccionado de entre el grupo que consiste en: Lys, Ala, Thr, Met y Leu en la posición correspondiente a la 409 y/o un resto seleccionado de entre el grupo que consiste en: Ala, Val, Gly, Ile y Leu en la posición correspondiente a 405 y donde dicho anticuerpo comprende opcionalmente una o más sustituciones, eliminaciones y/o inserciones adicionales, pero no comprenden la 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 se ha remplazado por la región CH3 de la IgG1 humana, de la IgG2 humana o de la IgG3 humana. Véase también el documento WO 2008145142 (Genmab).

El anticuerpo HER2 IgG4 estabilizado de la presente divulgación puede ser un anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde dicha cadena pesada comprende una región constante de IgG4 humana que tiene un resto seleccionado de entre el grupo que consiste en: Lys, Ala, Thr, Met y Leu en la posición correspondiente a la 409 y/o un resto seleccionado de entre el grupo que consiste en: Ala, Val, Gly, Ile y Leu en la posición correspondiente a 405, y donde dicho anticuerpo comprende opcionalmente una o más sustituciones, eliminaciones 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 se ha remplazado por la región CH3 de la IgG1 humana, de la

IgG2 humana o de la IgG3 humana.

El anticuerpo HER2 deficiente en la función efectora de la presente divulgación puede ser un anticuerpo de un tipo no IgG4, por ejemplo, IgG1, IgG2 o IgG3 que se han mutado de manera que la capacidad para mediar en funciones efectoras, tales como la ADCC se ha reducido o incluso eliminado. Dichas mutaciones se han descrito, por ejemplo, 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 o un anticuerpo HER2 biespecífico unido o conjugado con otro resto o un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco quimioterápico, una citocina, un inmunosupresor, o un radioisótopo. Se hace referencia a dichos conjugados en el presente documento como "inmunoconjugados". Se hace referencia a los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas como "inmunotoxinas".

Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial (por ejemplo, destruye) las células. Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados de la presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, maitansina o un análogo o derivado de los mismos, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puromicina; caliqueamicina o análogos o derivados de los mismos; antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbacina, hidroxiurea, asparaginasa, gemcitabina, clardribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, decarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados del platino, tal como carboplatino; así como duocarmicina A, duocarmicina SA, CC-1065 (a.k.a. raquelmicina), o análogos o derivados de CC-1065), antibióticos (tales como dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, daunorrubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)), agentes antimicóticos (por ejemplo, inhibidores de tubulina) tales como monometil auristatina E, monometil auristatina F, u otros análogos o derivados de dolastatina 10; toxina diftérica y moléculas relacionadas (tales como la cadena A de difteria y fragmentos activos de la misma y moléculas híbridas); toxina de ricino (tal como ricino A o una toxina de cadena A de ricino desglucosilado), toxina del cólera, una toxina tipo Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-IV), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina tetánica, inhibidor de proteasa de soja de Bowman-Birk, exotoxina de Pseudomonas, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolacca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinales, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y toxinas enomicinas. Otras moléculas conjugadas adecuadas incluyen antimicrobianos/péptidos líticos tales como CLIP, Magainina 2, melitina, cecropina, y P18; ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina-A estafilocócica, proteína antivirica de ombú, 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 se pueden administrar en combinación con un anticuerpo HER2 de la presente invención como se describe en otro sitio del presente documento, tal como, por ejemplo, citocinas anticáncer o quimioterapias, también son candidatos de restos terapéuticos útiles para la conjugación de un anticuerpo de la presente invención.

Un anticuerpo HER2 de la presente divulgación puede comprender un ácido nucleico conjugado o una molécula asociada con ácido nucleico. De acuerdo con una de dicha divulgación, el ácido nucleico conjugado es una ribonucleasa citotóxica, un ácido nucleico antisentido, una molécula de ARN inhibidor (por ejemplo, una molécula de ARNip) o un ácido nucleico inmunoestimulante (por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un motivo CpG inmunoestimulante). En otra realización, un anticuerpo HER2 de la invención se conjuga con un aptámero o una ribozima.

De acuerdo con la presente divulgación, se proporcionan anticuerpo HER2 que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Un anticuerpo HER2 radiomarcado se puede utilizar tanto para fines diagnósticos y terapéuticos (la conjugación con moléculas radiomarcadas es otra posible característica). Ejemplos no limitantes de marcadores para polipéptidos incluyen ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , y ^{125}I , ^{131}I , y ^{186}Re .

El anticuerpo se puede conjugar con un radioisótopo o con un quelado que contiene un radioisótopo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con un enlazador quelante, por ejemplo, DOTA, DTPA o tiuxetano, que permite que el anticuerpo forme un complejo con un radioisótopo. El anticuerpo también puede o alternativamente comprende o se conjuga con uno o más aminoácidos radiomarcados u otra molécula radiomarcada. Un Ab CD74 radiomarcado puede utilizarse para fines diagnósticos y terapéuticos. Ejemplos o limitantes de radioisótopos incluyen ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{186}Re , ^{213}Bi , ^{225}Ac y ^{227}Th .

Los anticuerpos HER2 también pueden estar modificados químicamente mediante conjugación covalente con un polímero, por ejemplo, para aumentar su semivida circulante. Los polímeros ejemplares, y los métodos para unirlos a

los péptidos se ilustran, por ejemplo, en 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).

5 Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo HER2 con la molécula(s) conjugada(s), tal como los que se han descrito anteriormente, incluyendo los métodos descritos 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 se pueden producir conjugando
10 químicamente el otro resto en el lado del extremo N o el lado del extremo C 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 del anticuerpo conjugado también se pueden generar por conjugación en restos o azúcares internos, si fuera apropiado.

15 Los agentes se pueden acoplar bien directa o indirectamente a un anticuerpo HER2 de la presente invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto de un segundo agente es el acoplamiento mediante un resto espaciador a un resto de cisteína o lisina en el anticuerpo. Un anticuerpo HER2 se puede conjugar a una molécula de profármaco que puede activarse *in vivo* en un fármaco terapéutico mediante un espaciador o enlazador. Después de la administración, los espaciadores o enlazadores se escinden por enzimas asociadas a las células tumorales u otras
20 condiciones específicas del tumor, por lo que se forma el fármaco activo. Ejemplos de dichas tecnologías de profármacos y enlazadores se describen en los documentos WO 02083180, WO 2004043493, WO 2007018431, WO 2007089149, y WO 2009017394 por Syntarga BV, *et al.* La tecnología anticuerpo-profármaco adecuada y los análogos de ducarmicina también se puede encontrar en la Patente de EE. UU. N.º 6.989.452 (Medarex).
25 El anticuerpo HER2 de la presente divulgación puede unirse a un enlazador quelante, por ejemplo, tiuxetan, que permite que el anticuerpo se conjugue con un radioisótopo.

Anticuerpos biespecíficos

30 En una realización, la invención se refiere a una molécula biespecífica que comprende un primer sitio de unión al antígeno de un anticuerpo HER2 de la invención como se ha descrito anteriormente en el presente documento y un segundo sitio de unión al 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 células T, un receptor de célula B o una especificidad de unión de un epítipo no solapado de HER2, es decir, un anticuerpo biespecífico donde el primer y el
35 segundo sitio de unión al antígeno no se bloquean de manera cruzada entre ellos por la unión a HER2, por ejemplo, cuando se ensaya como se describe en el Ejemplo 14.

Las moléculas de anticuerpos biespecíficos ejemplares de la presente divulgación comprende (i) dos anticuerpos, uno con una especificidad para HER2 y otro para una segunda diana que se conjugan juntas, (ii) un anticuerpo sencillo que tiene una cadena o brazo específico para HER2 y una segunda cadena o brazo específico para una
40 segunda molécula, (iii) una anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad para HER2 y una segunda molécula, por ejemplo, mediante dos scFv unidos en tándem por un enlazador peptídico extra; (iv) un anticuerpo de dominio variable dual (DVD-Ig), donde cada cadena ligera y cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem por medio de un enlace peptídico corto (Wu *et al.*, Generation y Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, En: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (v) un
45 fragmento (Fab')₂ biespecífico unido químicamente; (vi) un Tandab que es una fusión de dos diacuerpos de cadena sencilla que resulta en un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana; (vii) un flexicuerpo, que es una combinación de scFv con un diacuerpo que resulta en una molécula multivalente; (viii) una molécula denominada "acople y bloqueo", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" en la Proteína Cinasa A, que cuando se aplica a los Fab, puede dar lugar a una proteína de unión
50 biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (ix) una molécula denominada Scorpion, que comprende, por ejemplo, dos scFv fusionados 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, un cuerpo cruzado, o un biespecífico obtenido mediante un intercambio de brazo de Fab controlado como los que se describen en la presente invención.

55 Ejemplos de plataformas útiles para preparar anticuerpos biespecíficos incluyen, pero no se limitan a BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab y Mab² (F-star), IgG1 con Fc modificado (Xencor) o DuoCuerpo (basado en intercambio de brazo en el Fab, Genmab, la presente solicitud). Ejemplos de clases diferentes de anticuerpos biespecíficos incluyen, pero no se limitan a

- 60
- moléculas tipo IgG asimétricas, donde un lado de la molécula contiene la región Fab o parte de la región Fab de al menos un anticuerpo, y el otro lado de la molécula contiene la región Fab o partes de la región Fab de al menos otro anticuerpo; en esta clase, la asimetría en la región Fc también podría estar presente, y se utiliza para la unión específica de las dos partes de la molécula;
 - 65 • moléculas tipo IgG simétricas, donde los dos lados de la molécula contienen cada uno la región Fab o parte de la región Fab de al menos dos anticuerpos diferentes;

- moléculas de fusión IgG, donde los anticuerpos IgG de longitud completa se fusionan a regiones Fab extra o partes de regiones Fab;
- moléculas de fusión Fc, donde las moléculas de cadena Fv o diacuerpos estabilizados se fusionan con regiones Fc_γ o partes de los mismos;
- 5 • moléculas de fusión Fab, donde se fusionan fragmentos diferentes de Fab;
- moléculas basadas en scFv y diacuerpos donde las moléculas de Fv de cadena sencilla o diferentes diacuerpos se fusionan entre ellos o con otra molécula proteica o portadora.

10 Ejemplos de moléculas tipo IgG asimétricas incluyen, pero no se limitan al Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), los Botones en Ojales (Genentech), CrossMAbs (Roche) y el emparejado electrostáticamente (Amgen), la LUZ-Y (Genentech), el cuerpo de Dominio modificado de Intercambio de Cadena (EMD Serono), el Biclonico (Merus) y el DuoCuerpo (Genmab A/S).

15 Ejemplos de moléculas tipo IgG simétricas incluyen, pero no se limitan a Dual Targeting (DT)-Ig (GSK/Domantis), anticuerpo dos en uno (Genentech), Mab entrecruzados (Karmanos Cancer Center), mAb² (F-Star) y CovX-body (CovX/Pfizer).

Ejemplos de moléculas de fusión con IgG incluyen, pero no se limitan a Dominio Variable Dual (DVD)-Ig (Abbott), Biespecíficos tipo IgG (ImClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) y TvAb (Roche).

20 Ejemplos de moléculas de fusión con Fc incluyen, pero no se limitan a Fusiones scFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trucion, Zymogenetics/BMS), Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART) (MacroGenics) y Dual (ScFv)₂-Fab (National Research Center for Antibody Medicine - China).

Ejemplos de anticuerpos biespecíficos clase V incluyen, pero no se limitan a F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), Dual-Action o Bis-Fab (Genentech), Acople y Bloqueo (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotecnol) y Fab-Fv (UCB-Celltech).

25 Ejemplos de moléculas basadas en diacuerpos y scFv incluyen, pero no se limitan a Bispecific T Cell Engager (BiTE) (Micromet9, Tandem Diabody (Tandab) (Affimed), Dual Affinity Retargeting Technology (DART) (MacroGenics), Single-chain Diabody (Academic), TCR-like Antibodies (AIT, ReceptorLogics), Human Serum Albumin ScFv Fusion (Merrimack) y COMBODY (Epigen Biotech).

30 La segunda molécula puede ser un antígeno asociado a tumor/antígeno asociado a un cáncer tal como el antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de próstata (PSA), RAGE (antígeno renal), α-fetoproteína, CAMEL (antígeno reconocido por CTL en melanoma), antígenos CT (tal 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, mucin-CA125, etc.), antígenos de gangliósido, 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 α5β3. La segunda molécula puede ser un antígeno de célula T y/o célula NK, tal como CD3 o CD16. La segunda molécula puede ser un factor angiogénico u otro factor de crecimiento asociado al cáncer, tal como el factor de crecimiento endotelial vascular, un factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, angiogenina o un receptor de cualquiera de estos, particularmente receptores asociados con la progresión del cáncer (por ejemplo, cualquier otro de los receptores HER; HER1, HER3 o HER4). El segundo sitio de unión al antígeno puede unirse a un sitio diferente, preferentemente no bloqueante en el HER2 al que se une el anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la segunda molécula se puede derivar de, o bloquear de manera cruzada la unión a HER2 de, el trastuzumab, pertuzumab, F5 o C1.

45 Los métodos de preparación de anticuerpos biespecíficos incluyen los descritos en el documento WO 2008119353 (Genmab) y el publicado por van der Neut-Kolfschoten et al. (Science. Sep 2007 14;317(5844):1554-7) y pueden llevarse a cabo, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 20 de la presente invención.

50 Secuencias de ácidos nucleicos, vectores y células huésped

En un aspecto adicional, la invención se refiere a secuencias de ácido nucleico, tales como secuencias de ADN, que codifican cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo de la invención.

55 La presente divulgación proporciona una secuencia de ácido nucleico, que puede codificar la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26, 29, 32, 35, 39, 42, 46, 49, 53, 56, 60., 63, 67, 70, 74, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 y 126.

60 La secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos de VH seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 8, 15, 22, 29, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, y 125.

65 La secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos de VL seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 5, 12, 19, 26, 32, 39, 46, 53, 60, 67, 74, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, y 126.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un vector de expresión, o un conjunto de vectores de expresión, que codifican un anticuerpo de la invención. La cadena pesada y ligera del anticuerpo puede codificarse por el mismo vector o por un vector diferente.

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

El vector de expresión de acuerdo con la presente divulgación puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifique una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26, 29, 32, 35, 39, 42, 46, 49, 53, 56, 60,, 63, 67, 70, 74, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84,
10 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 y 126.

El vector de expresión de la presente divulgación puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifique una o más de las secuencias de aminoácidos de VH seleccionadas de entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 8, 15, 22, 29, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, y 125.

El vector de expresión de la presente divulgación puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifique una o más de las secuencias de aminoácidos de VL seleccionadas de entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 5, 12, 19, 26, 32, 39, 46, 53, 60, 67, 74, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, y 126.

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

Un vector de expresión en el contexto de la presente divulgación puede ser cualquier vector adecuado, incluyendo cromosómicos y no cromosómicos, y vectores de ácido nucleico sintético (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Ejemplos de dichos vectores incluyen derivados del SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fagos, baculovirus, plásmidos de levaduras, vectores derivados de combinaciones de ADN de fagos y plasmídico y vectores de ácido nucleico vírico (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo HER2 está comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe, por ejemplo, en Sykes y Johnston, *Nat Biotech* 17, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe, por ejemplo, en 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 minimalizado "mosquito" (como se describe, por ejemplo, en Schakowski et al., *Mol T HER2* 3, 793-800 (2001)), o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada CaP04 (como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/46147, Benvenisty y Reshef, *PNAS USA* 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 los usos de los mismos se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

Los vectores de expresión ejemplares para los anticuerpos de la presente divulgación también se describen en los Ejemplos 2 y 3.

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

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

Un vector de expresión también puede ser o ser de manera alternativa un vector adecuado para la expresión en células de mamífero, por ejemplo, un vector que comprenda glutamina sintetasa como marcador genético, tal como los vectores que se describen en Bebbington (1992) *Biotechnology (NY)* 10:169-175.

Un ácido nucleico y/o vector también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifique una secuencia de secreción/localización, que puede dirigirse a un polipéptido, tal como una cadena de polipéptido nascente, en el espacio periplásmico o dentro de un medio de cultivo celular. Dichas secuencias se conocen en la técnica e incluyen un líder de secreción o péptidos de señal.

65

En un vector de expresión de la presente divulgación, los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo HER2 pueden comprender o asociarse con cualquier promotor, amplificador, y otros elementos que faciliten la expresión adecuados. Ejemplos de dichos elementos incluyen promotores fuertes de la expresión (por ejemplo, CMV humano, promotor/amplificador IE, así como promotores RSV, SV40, SL3-3, MMTV, y HIV LTR), secuencias de terminación poli(A) eficaces, un origen de replicación para el producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador genético, 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.

El vector de expresión que codifica el anticuerpo HER2 de acuerdo con la presente divulgación se puede posicionar en y/o suministrarse a la célula huésped o animal huésped mediante un vector vírico.

En un aspecto adicional más, la invención se refiere a una célula huésped recombinante procariota o eucariota, tal como un transfectoma, que produce un anticuerpo de la invención como se define en el presente documento. Ejemplos de células huésped incluyen células de levadura, bacterianas y de mamífero, tales como células CHO o HEK. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona una célula que comprende un ácido nucleico integrado establemente 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 como se define en el presente documento.

La presente divulgación se refiere adicionalmente a un hibridoma que produce un anticuerpo de la invención como se define en el presente documento. También se desvelan un animal no humano o planta transgénicos que comprenden ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humana y una cadena ligera humana, donde el animal o planta producen un anticuerpo de la invención.

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

- a) el cultivo de un hibridoma o una célula huésped de la invención como se ha descrito anteriormente en el presente documento, y
- b) la purificación del anticuerpo de la invención a partir del medio de cultivo.

Composiciones

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.

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.

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

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardantes de la absorción adecuados, y similares que sean fisiológicamente compatibles con un compuesto de la presente invención. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina tampón de fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como el glicerol, propilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, soluciones de carboximetilcelulosa coloidal, goma de tragacanto i ésteres orgánicos inyectables, tales como etil oleato, y/o distintos tampones. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también puede comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables por ejemplo, (1) antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes liposolubles, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y

similares; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como el ácido cítrico, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

5 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 las composiciones.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración escogida tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que pueden aumentar la vida de almacenamiento o la eficacia de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente invención se pueden preparar con vehículos que protejan 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 biocompatibles tales como acetato de vinilo etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones son conocidos en general por los expertos en la técnica.

20 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el principio activo en la cantidad necesaria en una disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, por ejemplo, como se ha enumerado anteriormente, según se necesite, seguido por esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios, por ejemplo, de entre 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 por congelación (liofilización) que dan lugar a un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución esterilizada por depresión previamente.

30 Los niveles de dosificación actuales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas se pueden variar de manera que se obtenga una cantidad de principios activos que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición y modo de administración, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención que se emplee, o la amida de la misma, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se va a emplear, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuesto y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historia médica anterior del paciente que se va a tratar, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

40 La composición farmacéutica se puede administrar por cualquier vía o modo adecuados. En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral. "Administrado por vía parenteral" como se utiliza en el presente documento significa modos de administración distintos de la administración tópica y entérica, habitualmente por inyección, e incluye la inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal.

45 En una realización, la composición farmacéutica se administra por inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

Usos

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

55 Los anticuerpos HER2 de la invención se puede utilizar para varios fines. En particular, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para el tratamiento de distintas formas de cáncer, incluyendo el cáncer metastático y el cáncer refractario.

En una realización, los anticuerpos HER2 de la invención se utilizan para el tratamiento del cáncer de mama. El cáncer de mama puede incluir el cáncer de mama primario, metastático, y refractario.

60 En una realización, los anticuerpos HER2 de la invención se utilizan para el tratamiento de una forma de cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga, cáncer ovárico, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, 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).

65 De manera similar, la presente divulgación se refiere a un método para destruir una célula tumoral que expresa HER2, que comprende la administración, a un individuo que lo necesite, de una cantidad eficaz de un anticuerpo de

la invención, tal como un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC).

5 Dicha célula tumoral puede estar implicada en una forma de cáncer seleccionada de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga, cáncer ovárico, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer esofágico y 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).

10 Puede ser que la célula tumoral co-exprese HER2 y al menos otro miembro de la familia EGFR, HER3, o EGFR y HER3, y es una célula tumoral implicada en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer endometrial/cervical, cáncer de pulmón, melanoma maligno, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer testicular, un tumor de tejido blando (por ejemplo, sarcoma sinovial), o cáncer de vejiga.

15 La presente divulgación se refiere adicionalmente a un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto, que comprende la selección de un sujeto que padece un cáncer que comprende células tumorales que co-expresen HER2 y EGFR y/o HER3, y la administración al sujeto de un anticuerpo de la invención, opcionalmente en forma de un anticuerpo conjugado con un agente o fármaco citotóxico. El sujeto puede padecer un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer endometrial/cervical, cáncer de pulmón, melanoma maligno, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer testicular, un tumor de tejido
20 blando (por ejemplo, sarcoma sinovial), o cáncer de vejiga.

También, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal que se une a un HER2 humano para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, tal como una de las indicaciones específicas mencionadas anteriormente.

25 La presente divulgación se refiere adicionalmente a un anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento del cáncer, tal como una de las indicaciones de cáncer mencionadas anteriormente.

30 En los métodos de tratamiento de la presente divulgación, la eficacia del tratamiento se puede controlar durante la terapia, o ejemplo, en momentos predeterminados, determinando la carga tumoral o los niveles de expresión de HER2 en las células tumorales relevantes.

35 Los regímenes de dosificación de los métodos de tratamiento anteriores y sus usos se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar una única embolada, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales se pueden formular en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de dosificación.

40 Las dosis y los regímenes de dosificación eficaces para los anticuerpos HER2 dependen de la enfermedad o afección que se va a tratar y pueden determinarse por los expertos en la técnica. Un intervalo ejemplar, no limitante 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,
45 aproximadamente 1, aproximadamente 3, aproximadamente 5, o aproximadamente 8 mg/kg.

50 Un médico o veterinario que tenga una experiencia en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de anticuerpo HER2 empleado en la composición farmacéutica a niveles menores de los necesarios con el fin de conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta alcanzar el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la presente invención sería la cantidad del compuesto que es la menor dosis eficaz para producir un efecto terapéutico. La administración puede ser, por ejemplo, parenteral, tal como intravenosa, intramuscular o subcutánea. En una realización, los anticuerpos HER2 se pueden administrar mediante infusión en una dosificación semanal de desde 10 a 500 mg/m², tal como desde 200 a 400
55 mg/m². Dicha administración se puede repetir, por ejemplo, 1 a 8 veces, tal como 3 a 5 veces. La administración se puede llevar a cabo por infusión continua durante un periodo de desde 2 a 24 horas, tal como de desde 2 a 12 horas. Los anticuerpos HER2 se puede administrar mediante infusión continua lenta durante un periodo largo, tal como más de 24 horas, con el fin de reducir los efectos secundarios tóxicos.

60 Los anticuerpos HER2 se pueden administrar en una dosificación semanal de desde 250 mg a 2000 mg, tal como por ejemplo 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg o 2000 mg, durante hasta 8 veces tal como desde 4 a 6 veces cuando se da una vez a la semana. Dicho régimen se puede repetir una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación se puede determinar o ajustar midiendo la cantidad de compuesto de la presente invención en la sangre al administrarse, por ejemplo, sacando una muestra biológica y utilizando anticuerpos anti-idiotípicos que se dirigen contra la región de unión al antígeno de los anticuerpos HER2
65 de la presente invención.

Las dosis y los regímenes de dosificación eficaces para los anticuerpos biespecíficos dependen de la enfermedad o afección que se va a tratar y pueden determinarse por los expertos en la técnica. Un intervalo ejemplar, no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico 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.

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

Un anticuerpo HER2 también se puede administrar profilácticamente con el fin de reducir el riesgo de desarrollar un cáncer, retrasar la aparición de la existencia 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 se pueden administrar en una terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes terapéuticos relevantes para la enfermedad o afección que se va a tratar. En consecuencia, el medicamento que contiene el anticuerpo puede ser para su combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como, un agente citotóxico, quimioterápico o anti-angiogénico.

Dicha administración combinada puede ser simultánea, separada o secuencial. Para la administración simultánea los agentes se pueden administrar como una composición o como composiciones separadas, según sea apropiado. La presente divulgación también proporciona por lo tanto métodos para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan HER2 como se ha descrito anteriormente, cuyos métodos comprenden la administración de un anticuerpo HER2 de la presente divulgación combinada con uno o más agentes terapéuticos como se ha descrito anteriormente.

La presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan HER2 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo HER2 de la presente divulgación, y opcionalmente al menos un agente terapéutico adicional, o un anticuerpo que se une a un epítipo diferente que dicho anticuerpo HER2, a un sujeto que necesita el mismo.

La presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o prevención del cáncer, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo HER2 de la presente invención, y al menos un agente terapéutico adicional a un sujeto que lo necesite.

Dicho agente terapéutico adicional puede seleccionarse de entre un antimetabolito, tal como el metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina, hidroxiurea, asparaginasa, gemcitabina o cladribina.

De manera alternativa, dicho agente terapéutico adicional puede seleccionarse de entre un agente alquilante, tal como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozocina, decarbacina (DRIC), procarbina, mitomicina C, cisplatino y otros derivados del platino, tal como carboplatino.

De manera alternativa, dicho agente terapéutico adicional puede seleccionarse de entre un agente antimicótico, tales como taxanos, por ejemplo, docetaxel, y paclitaxel, y alcaloides de la vinca, por ejemplo, vindesina, vincristina, vinblastina y vinorelbina.

De manera alternativa, dicho agente terapéutico adicional puede seleccionarse de entre un inhibidor de la topoisomerasa, tal como topotecan o irinotecan, o un fármaco citostático, tal como etopósido o tenipósido.

Dicho agente terapéutico adicional se puede seleccionar de entre un inhibidor de un 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 del EGFR, tal 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 tanto de EGFR como de HER2, tal como lapatinib).

De manera alternativa, dicho agente terapéutico adicional puede seleccionarse de entre un inhibidor de tirosina cinasa, tal como imatinib (Glivec, Gleevec STI571) o lapatinib, PTK787/ZK222584.

La presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan HER2 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo HER2 de la presente invención y al menos un inhibidor de la angiogénesis, neovascularización, y/o otra vascularización a un sujeto que los necesite.

Ejemplos de dichos inhibidores de la angiogénesis son los inhibidores de urocinasa, inhibidores de metaloproteasa de la matriz (tales como marimastat, neovastat, BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 y agentes similares), inhibidores de migración y proliferación celular endotelial (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 antiangiogénicos 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 y otros inhibidores de la tirosina cinasa antiangiogénicos (tales como SU011248), inhibidores de la señalización de supervivencia/integrina específica endotelial (tales como vitaxin y agentes similares), antagonistas /quelantes del cobre (tal como tetratiomolibdato, captopril y agentes similares), carboxiamido-triazol (CAI), ABT-627, CM 101, interleucina -12 (IL-12), IM862, PNU145156E así como moléculas de nucleótido que inhiben la angiogénesis (tales como ADNc-VEGF antisentido, ADNc que codifica angiostatina, ADNc que codifica p53 y ADNc que codifica el receptor-2 deficiente de VEGF).

Otros ejemplos de dichos inhibidores de la angiogénesis, neovascularización, y/u otra vascularización son derivados de la heparina anti-angiogénica (por ejemplo, heparinasa III), temozolomida, NK4, factor inhibidor de la migración de macrófagos, inhibidores de la ciclooxigenasa-2, inhibidores del factor 1 inducible por hipoxia, isoflavonas de soja anti-angiogénicas, oltipraz, fumagilina y análogos de la misma, análogos de somatostatina, polisulfato de pentosano, tecogalan sódico, dalteparina, tumestatina, trombospondina, NM-3, combrestatina, canstatina, avastatina, anticuerpos contra otras dianas, tales como integrina anti-alfa-v/beta-3 y anticuerpos anti-quininostatina.

Un agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente puede ser un inmunógeno anticáncer, tal como un antígeno del cáncer/antígeno asociado a un tumor (por ejemplo, la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM/TACSTD1), mucina 1 (MUC1), antígeno carcinoembrionario (CEA), glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG-72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, vacunas víricas asociadas al cáncer (por ejemplo, vacunas de papilomavirus humano) o proteínas de choque térmico derivadas de tumores.

Un agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente puede ser una citocina anticáncer, quimiocina, o combinaciones de las mismas. 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, IFN α 2b), IFN β , GM-CSF, CD40L, ligando de Flt3, factor de células madre, ancestim, y TNF α . Las quimiocinas adecuadas incluyen quimiocinas negativas a Glu-Leu-Arg (ELR) tales como IP-10, MCP-3, MIG, y SDF-1 α del CXC humano y familias de quimiocinas C-C. Las citocinas adecuadas incluyen derivados de citocina, variantes de citocina, fragmentos de citocinas y proteínas de fusión con citocinas.

Un agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para el tratamiento de los trastornos descritos 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 direccionan 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 sobre estimulan en ciclo celular (tales como el flavopiridol (L868275, HMR1275), 7-hydroxiestaurosporina (UCN-01, KW-2401), y roscovitina (R-roscovitina, CYC202)), y (iii) moduladores de la telomerasa (tales como BIBR1532, SOT-095, GRN163 y las composiciones descritas por ejemplo en los documentos US 6.440.735 y US 6.713.055). Ejemplos no limitantes de moléculas que interfieren con las rutas apoptóticas incluyen ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL)/ligando-2 de apoptosis (Apo-2L), anticuerpos que activan los receptores TRAIL, IFN, D y Bcl-2 antisentido.

Un agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para el tratamiento de trastornos como se ha descrito anteriormente puede ser un agente regulador hormonal, tales como los agentes útiles para la terapia antiandrogénica y antiestrogénica. Ejemplos de dichos agentes reguladores hormonales son el tamoxifeno, idoxifeno, fulvestrant, droloxifeno, toremifeno, raloxifeno, dietilestilbestrol, etinil estradiol/etinil, un antiandrógeno (tal como flutamida/eulexina), una progestina (tal como caproato de hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona/provera, acepato de megestrol/megace), un adrenocorticosteroide (tal como hidrocortisona, prednisona), una hormona liberadora de hormona luteinizante (y análogos de la misma y otros agonistas de la LHRH tales como buserelina y goserelina), un inhibidor de la aromatasas (tal como anastrozol/arimidex, aminoglutetimida/citraden, exemestano) o un inhibidor hormonal (tal como octreotida/-sandostatina).

Un agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para el tratamiento de los trastornos que se han descrito anteriormente puede ser un agente anti-anérgico, dichos compuestos son moléculas que bloquean la actividad del CTLA-4, por ejemplo, ipilimumab.

Un agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente puede ser un ácido nucleico anticáncer, o una molécula de ARN inhibidora anticáncer.

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

Ejemplos de otros agentes anticáncer, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para el tratamiento de los trastornos que se han descrito anteriormente son estramustina y epirrubicina.

Ejemplos de otros agentes anticáncer, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para el tratamiento de los trastornos que se han descrito anteriormente son un inhibidor de la HSP90 como el 17-alil amino geldanamicina, anticuerpos dirigidos contra un antígeno tumoral tal como PSA, CA125, KSA, integrinas, por ejemplo, integrina β 1, o inhibidores de VCAM.

Ejemplos de otros agentes anticáncer, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con un anticuerpo HER2 para el tratamiento de los trastornos que se han descrito anteriormente son inhibidores de calcineurina (tal como valsopodar, PSC 833 y otros inhibidores de MDR-1 o p-glicoproteína), inhibidores de TOR (tales como sirolimus, everolimus y rapamicina), e inhibidores de mecanismos de "asentamiento de linfocitos" (tales como FTY720), y agentes con efectos sobre la señalización celular tal como inhibidores de la molécula de adhesión (por ejemplo anti-LFA).

El anticuerpo HER2 de la presente invención puede utilizarse en combinación con uno o más anticuerpos terapéuticos, tales como ofatumumab, zanolimumab, daratumumab, ranibizumab, nimotuzumab, panitumumab, hu806, daclizumab (Zenapax), basiliximab (Simulect), infliximab (Remicade), adalimumab (Humira), natalizumab (Tysabri), omalizumab (Xolair), efalizumab (Raptiva) y/o rituximab.

Se pueden utilizar dos o más anticuerpos diferentes de la presente divulgación como se ha descrito en el presente documento en combinación para el tratamiento de una enfermedad. Las combinaciones particularmente interesantes incluyen dos o más anticuerpos no bloqueantes. Dicha terapia de combinación puede dar lugar a la unión de un número mayor de moléculas de anticuerpo por célula, lo que puede aumentar la eficacia, por ejemplo, mediante la activación de la lisis mediada por complemento.

Además de todo lo anterior, otras divulgaciones de terapias de combinación incluyen las siguientes: Para el tratamiento del cáncer de mama, un anticuerpo HER2 o un conjugado terapéutico del mismo, en combinación con metotrexato, paclitaxel, doxorubicina, carboplatino, ciclofosfamida, daunorrubicina, epirrubicina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, ixabepilona, mutamicina, mitoxantrona, vinorelbina, docetaxel, tiotepa, vincristina, capecitabina, un anticuerpo EGFR (por ejemplo, zalutumumab, cetuximab, panitumumab o nimotuzumab) u otro inhibidor del EGFR (tal como gefitinib o erlotinib), otro anticuerpo HER2 o conjugado (tal como, por ejemplo, trastuzumab, trastuzumab-DM1 o pertuzumab), un inhibidor de ambos EGFR y HER2 (tal como lapatinib), y/o en combinación con un inhibidor de HER3.

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

Para el tratamiento de un cáncer colorrectal un anticuerpo HER2 en combinación con uno o más compuestos seleccionados de entre gemcitabina, bevacizumab, FOLFOX, FOLFIRI, XELOX, IFL, oxaliplatino, irinotecan, 5-FU/LV, Capecitabina, UFT, agentes dirigidos contra el EGFR tales como cetuximab, panitumumab, zalutumumab; inhibidores del VEGF, o inhibidores de tirosina cinasa tales como el sunitinib.

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

Radioterapia - cirugía

La presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan HER2 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo HER2, tal como un anticuerpo HER2 de la presente invención y radioterapia a un sujeto que lo necesite.

La presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o prevención del cáncer, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo HER2, tal como un anticuerpo HER2 de la presente invención y radioterapia a un sujeto que lo necesite.

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

10 La radioterapia puede comprender la radiación o se proporciona la administración asociada de compuestos radiofarmacéuticos a un paciente. La fuente de radiación puede ser tanto externa como interna al paciente que se va a tratar (el tratamiento por radiación puede ser, por ejemplo, en forma de una terapia de radiación de rayo externo (EBRT) o braquiterapia (BT)). Los elementos radiactivos que se pueden utilizar en la práctica de dichos métodos incluyen, por ejemplo, radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yodo-123, yodo-131 e indio-111.

15 La presente divulgación también proporciona un método para el tratamiento o prevención del cáncer, cuyo método comprende la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo HER2, tal como un anticuerpo HER2 de la presente invención en combinación con cirugía.

20 Usos diagnósticos

Los anticuerpos HER2 de la presente divulgación también se pueden utilizar con fines diagnósticos. Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a una composición diagnóstica que comprende un anticuerpo HER2 como se define en el presente documento.

25 Los anticuerpos HER2 de la presente divulgación se pueden utilizar *in vivo* o *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades en las que las células activadas que expresan HER2 tienen un papel activo en la patogénesis, detectando los niveles de HER2 o los niveles de células que contienen HER2 en su superficie de membrana. Esto se puede conseguir, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra que se va a ensayar, opcionalmente junto con una muestra de control, con el anticuerpo HER2 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y el HER2.

30 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la detección de la presencia del antígeno HER2, o una célula que exprese 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 el HER2; y
- analizar si se ha formado un complejo.

40 El método se puede llevar a cabo *in vitro*.

Más específicamente, la presente divulgación proporciona métodos para la identificación de, y el diagnóstico de células y tejidos invasivos y otras celas direccionadas por los anticuerpos HER2 de la presente invención, y para el control del progreso de los tratamientos terapéuticos, estado después del tratamiento, riesgo de desarrollar un cáncer, progresión del cáncer, y similares.

Los marcadores adecuados para el anticuerpo HER2 y/o anticuerpos secundarios que se utilizan en dichas técnicas son bien conocidos en la técnica.

50 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit para la detección de la presencia del antígeno HER2, o una célula que exprese HER2 en una muestra que comprende

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

55 La presente divulgación proporciona un kit para el diagnóstico del cáncer que comprende un recipiente que comprende un anticuerpo HER2, y uno o más reactivos para la detección de la unión del anticuerpo HER2 al HER2. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, u otros marcadores detectables. Los reactivos pueden incluir también anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para las reacciones enzimáticas, cuando las reacciones enzimáticas producen un producto que se pueda visualizar.

60 Anticuerpos anti-idiotípicos

65 La presente divulgación también se refiere a un anticuerpo anti-idiotípico que se une a un anticuerpo HER2 de la presente divulgación.

Un anticuerpo anti-idiotípico (Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo Id se puede preparar inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético que la fuente de un mAb HER2 con el mAb contra el que se va a preparar el anti-Id. El animal inmunizado normalmente puede reconocer y responder a los determinantes idiotípicos del anticuerpo
5 inmunizante produciendo un anticuerpo contra 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 más, produciendo un llamado anticuerpo anti-anti-Id. Un anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al mAb original que indujo el anti-Id. Por lo tanto, utilizando anticuerpos contra determinantes idiotípicos de un mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica.
10

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no se deben considerar como limitantes del alcance de la invención.

15 Ejemplos

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

Se generaron las construcciones con el codón completamente optimizado para la expresión de HER2 de longitud completa (1255 aa, Swissprot P04626), el dominio extracelular (ECD) de HER2 (Her2-ECDHis, aa 1-653 con un marcador His6 en el extremo C), la variante de corte y empalme HER2 de origen natural (er2-delex16, resultante de la eliminación del exón 16 y la carencia de los aa 633-648) y una forma truncada del receptor de HER2 (Her2-recortado, aa 648-1256). La construcción contenía los sitios de restricción adecuados para la clonación y una secuencia Kozak óptima (Kozak, M., Gene 1999;234(2): 187-208). Las construcciones se clonaron en el vector de expresión en mamíferos pEE13.4 (Lonza Biologics; Bebbington, C.R., et al., Biotechnology (N Y) 1992;10(2):169-75) y se secuenciaron completamente para confirmar la corrección de la construcción.
20
25

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

Se generaron las construcciones con el codón completamente optimizado para la expresión de la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de los anticuerpos IgG1 pertuzumab, C1 y F5 en células HEK. Las regiones variables codificadas por estas construcciones eran idénticas a las descritas en la patente de EE. UU. N.º 6.949.245 para la cadena pesada y cadena ligera del pertuzumab y la patente de EE. UU. N.º 7.244.826 para la cadena pesada y ligera de C1 y F5. Para C1 y F5, se utilizaron los vectores de expresión en mamíferos p33G1f y p33K o p33L (pcDNA3.3 (Invitrogen)) que contenían la región constante con el codón completamente optimizado para la cadena pesada de la IgG1 humana (alotipo f), la cadena ligera kappa humana o la cadena ligera lambda humana, respectivamente. Para el pertuzumab, se utilizaron los vectores de expresión en mamíferos pG1f (pEE12.4 (Lonza Biologics) y pKappa (pEE6.4 (Lonza Biologics) que contenían la región constante con el codón completamente optimizado para la cadena pesada de la IgG1 humana (alotipo f) y la cadena ligera kappa humana, respectivamente.
30
35
40

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

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

Se obtuvieron las células Freestyle™ 293-F (un clon de HEK-293 adaptado al cultivo en suspensión y el medio Freestyle definido químicamente (HEK-293F)) en 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 co-expresaron los vectores de expresión de cadena pesada y cadena ligera apropiados.
45
50

Se transfectó transitoriamente la línea celular Freestyle™ CHO-S (Invitrogen) con pEE13.4Her2, pEE13.4Her2-delex16 y pEE13.4Her2-recortado utilizando el reactivo de transfección Freestyle MAX (Invitrogen). Se ensayó la expresión de HER2 y Her2-delex16 mediante análisis FACS como se describe posteriormente.

55 Ejemplo 4 - Expresión de un agrupamiento policlonal estable en NS0

Se transfectaron las células NS0 con pEE13.4Her2, pEE13.4Her2-delex16 y pEE13.4Her2-recortado en mediante nucleofección (Amaxa). Un agrupamiento de células transfectadas establemente se estableció después de la selección por crecimiento dependiente de glutamina, basándose en el marcador de selección de glutamina sintetasas integrado (Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 2000;32(2):109-123).
60

Ejemplo 5 - Purificación de HER2 marcado con His

Se expresó Her2ECDHis en células HEK-293F. El marcador His en Her2ECDHis hacía posible la purificación por cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, ya que la proteína marcada con His se unen fuertemente a las perlas de resina, mientras que las otras proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo no se unen fuertemente.
65

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

Ejemplo 6 - Procedimiento de inmunización de ratones transgénicos

Los anticuerpos 001, 019, 021, 025, 027, 032, 033, 035, 036, 049, 050, 051, 054, 055, 084, 091, 094, 098, 100, 105, 123 y 124 se derivaron de la siguiente inmunización: tres ratones hembra HCo12, un macho y dos hembras de ratón HCo12-Balb/C, un ratón macho HCo17 y un ratón macho HCo20 (Medarex, San José, CA, USA) se inmunizaron de manera alterna con 5×10^6 células NS0 transfectadas transitoriamente con Her2ECD por vía intraperitoneal (IP) y 20 μg de proteína Her2ECDHis acoplada al hapteno de hemocianina de lapa californiana (KLH) por vía subcutánea (Sc) en la base de la cola, con un intervalo de catorce días. Se llevaron a cabo un máximo de ocho inmunizaciones por ratón (cuatro inmunizaciones IP y cuatro inmunizaciones SC). La primera inmunización con células se hizo con adyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Para las demás inmunizaciones, las células se inyectaron por vía IP en PGBS y la Her2ECD acoplada a KLH se inyectó por vía SC utilizando adyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA).

Los anticuerpos 125, 127, 129, 132, 152, 153 y 159 se derivaron de la siguiente inmunización: un macho y dos hembras de ratón HCo12-Balb/C, una hembra de ratón HCo20 y una hembra de ratón HCo12 (Medarex) se inmunizaron de manera alterna con 5×10^6 células NS0 transfectadas transitoriamente con Her2delex16 por vía IP y 20 μg de proteína Her2ECDHis acoplada al hapteno de hemocianina de lapa californiana (KLH) por vía SC en la base de la cola, con un intervalo de catorce días. Se llevaron a cabo un máximo de ocho inmunizaciones por ratón (cuatro inmunizaciones IP y cuatro inmunizaciones SC). La primera inmunización con células se hizo con adyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Para las demás inmunizaciones, las células se inyectaron por vía IP en PGBS y la Her2ECD acoplada a KLH se inyectó por vía SC utilizando adyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA).

Los anticuerpos 143, 160, 161, 162, 166 y 169 se derivaron de la siguiente inmunización: una hembra y un macho de ratón HCo12, una hembra de ratón HCo12-Balb/C, un macho de ratón HCo17 y un macho de ratón HCo20 (Medarex) se inmunizaron de manera alterna con 20 μg de proteína Her2ECDHis acoplada al hapteno de hemocianina de lapa californiana (KLH) alternando la vía IP y la vía SC en la base de la cola, con un intervalo de catorce días. Se llevaron a cabo un máximo de ocho inmunizaciones por ratón (cuatro inmunizaciones IP y cuatro inmunizaciones SC). La primera inmunización con células se hizo por vía IP con adyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). El resto de las inmunizaciones se inyectaron utilizando adyuvante incompleto de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA).

Los ratones con al menos dos títulos secuenciales contra TC1014-Her2, TC1014-Her2delex16 o TC1014-Her2recortado en el ensayo de exploración FMAT específico de antígeno (como se describe en el Ejemplo 7) se consideraron positivos y se fusionaron.

Ejemplo 7 - Ensayo de exploración homogénea específica de antígeno

La presencia de anticuerpos HER2 en el suero de los ratones inmunizados o el sobrenadante de cultivo de hibridoma o transfectoma HuMab (anticuerpo monoclonal humano) se determinó mediante ensayos de exploración específica de antígenos homogéneos (cuadrante cuatro) utilizando una tecnología de ensayo de Micro volumen fluorométrico (FMAT; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para esto se utilizó una combinación de 4 ensayos basados en células. Se determinó la unión a TC1014-Her2 (células HEK-293F que expresan transitoriamente el receptor HER2, producidas como se ha descrito anteriormente), TC1014-Her2delex16 (células HEK-293F que expresan transitoriamente el dominio extracelular de Her2-delex (una mutación del receptor HER2 con una eliminación del aminoácido 16), producidas como se ha descrito anteriormente) y TC1014-Her2recortado (células HEK-293F que expresan transitoriamente el dominio extracelular recortado del receptor HER2, producidas como se ha descrito anteriormente) así como células HEK293 de tipo silvestre (células de control negativo que no expresan HER2). Las muestras se añadieron 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). Se utilizó TH1014-Pertuzumab (producido en células HEK-293F) como control positivo y se utilizaron sueros agrupados de ratón HuMab y HuMab-KLH como controles negativos. Las muestras se exploraron utilizando un Sistema de Detección Celular Applied Biosystems 8200 (8200 CDS) y se utilizaron los 'recuentos x fluorescencia' como lectura. Las muestras se establecieron como positivas cuando los recuentos eran mayores de 50 y los recuentos x fluorescencia eran al menos tres veces mayores que el control negativo.

Ejemplo 8 - Generación del hibridoma HuMab

Los ratones HuMab con un desarrollo de títulos específicos de antígeno suficiente (definidos como anteriormente) se

sacrificaron y se recolectaron el bazo y los ganglios linfáticos que flanquean la aorta abdominal y la vena cava. Se hizo una fusión de los esplenocitos y las células de los ganglios linfáticos con una línea de mieloma de ratón mediante electrofusión, utilizando un Sistema de Electrofusión CEEF 50 (Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, USA), esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, los pocillos primarios se subclonaron utilizando el sistema ClonePix (Genetix, UK). En este pocillo de hibridoma primario específico del extremo se sembraron en medio semisólido producido a partir de un 40 % de CloneMedia (Genetix, Hampshire, UK) y un 60 % de 2x de medio completo HyQ (Hyclone, Waltham, USA). Los subclones se volvieron a ensayar en el ensayo de unión específica del antígeno como se ha descrito en el Ejemplo 7 y se midieron los niveles de IgG utilizando un Octet (Fortebio, Menlo Park, USA) con el fin de seleccionar el clon más específico y mejor productor por pocillo primario para la expansión posterior. La expansión posterior y el cultivo de los hibridomas HuMab resultantes se hizo basándose en protocolos convencionales (por ejemplo, como se describe en Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. y Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006). Los clones derivados mediante este procedimiento se denominaron PC1014.

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

Se purificaron pequeñas alícuotas de 0,8 ml de sobrenadante que contenía anticuerpos de la placa de 6 pocillos o Hyperflask utilizando columnas PhyTip que contenían resina con proteína G (PhyNexus Inc., San Jose, USA) en un cubículo Sciclone ALH 3000 (Caliper Lifesciences, Hopkinton, USA). Las columnas PhyTip se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, aunque los tampones se sustituyeron por: Tampón de unión PBS (B. Braun, Medical B.V., Oss, Países Bajos) y tampón de elución 0,1 M de Glicina-HCl pH 2,7 (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Alemania). Después de la purificación, las muestras se neutralizaron con 2 M de Tris-HCl, pH 9,0 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). De manera alternativa, en algunos casos se purificaron mayores volúmenes de sobrenadante de cultivo utilizando MabSelect SuRe.

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

Tras desentrañarlos, se compararon las masas resultantes de la cadena y ligera para todas las muestras con el fin de encontrar anticuerpos duplicados. Esto se debía a veces a la presencia de una cadena ligera extra, pero en la comparación de cadenas pesadas, también se tuvo en cuenta la posible presencia de variantes de lisina en el extremo C. Esto daba como resultado una lista de anticuerpos únicos, es decir, una combinación única de cadenas pesadas y ligeras. En el caso de encontrar anticuerpos duplicados, se seleccionó un único anticuerpo basándose en los resultados de otros ensayos.

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

Se preparó el ARN total de los HuMab HER2 a partir de 5×10^6 células de hibridoma y se preparó el ADN complementario 5'-RACE (ADNc) a partir de 100 ng de ARN 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 por PCR y se clonaron directamente, en fase, en los vectores de expresión pG1r y pKappa, mediante clonación de unión independiente (Aslanidis, C. y P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990;18(20): 6069-74). Los clones derivados mediante este procedimiento se denominaron TH1014. Para cada anticuerpo, se secuenciaron 16 clones de VL y 8 clones de VH. Los clones con una masa de cadena pesada y ligera prevista de acuerdo con la masa del material derivado del hibridoma del mismo anticuerpo (según se determinó por la espectrometría de masas) se seleccionaron para su estudio y expresión posterior.

Las secuencias resultantes se muestran en las Figuras 1 y 2 y en el Listado de Secuencias. Las secuencias seleccionadas también se describen posteriormente con más detalle. 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, Tabla 2 y Tabla 3 dan una revisión de la información de secuencia de los anticuerpos o las secuencias de la línea germinal, y la Tabla 4 muestra las secuencias de consenso.

ES 2 733 921 T3

Tabla 1: Secuencias de la región variable de cadena pesada (VH), región variable de cadena ligera (VL) y CDR de los HuMab 169, 050, 084, 025, 091, 129, 127, 159, 098, 153, y 132.

SEQ ID NO: 1	VH 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGISW VRQAPGGLEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMT TDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIVRPDYF DYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 2	VH 169, CDR1	GYTFTNYG
SEQ ID NO: 3	VH 169, CDR2	LSAYSGNT
SEQ ID NO: 4	VH 169, CDR3	ARDRIVRPDYFDY
SEQ ID NO: 5	VL 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 6	VL 169, CDR1	QSVSSY
	VL 169, CDR2	DAS
SEQ ID NO: 7	VL 169, CDR3	QQRSNWPRT
SEQ ID NO: 8	VH 050	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNW VRQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDY WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 9	VH 050, CDR1	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 10	VH 050, CDR2	ISGRGGTT
SEQ ID NO: 11	VH 050, CDR3	AKARANWDYFDY
SEQ ID NO: 12	VL 050	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWY QHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGRLEIK
SEQ ID NO: 13	VL 050, CDR1	QGISSW
	VL 050, CDR2	AAS
SEQ ID NO: 14	VL 050, CDR3	QQANSFPIT
SEQ ID NO: 15	VH 084	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFRTYAINW VRQAPGQGLEWMGRINTVLGIVNHAQKFQGRVTITA DKSTNTAYMELNSLRSEDTAVYYCAREKGVDDYYGIE VWGQGTITVTVSS
SEQ ID NO: 16	VH 084, CDR1	GGTFRTYA
SEQ ID NO: 17	VH 084, CDR2	INTVLGIV
SEQ ID NO: 18	VH 084, CDR3	AREKGVDDYYGIEV
SEQ ID NO: 19	VL 084	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWY QHKPGKAPKLLIYVASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 20	VL 084, CDR1	QGISSW
	VL 084, CDR2	VAS
SEQ ID NO: 21	VL 084, CDR3	QQANSFPLT
SEQ ID NO: 22	VH 025	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAVYGGSFSDYYWN WIRQPPGKGLEWIGIEIHHSGSTNYPNPSLKRVTISVD TSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYYDSGVVYFDY WAQGLTVTVSS

ES 2 733 921 T3

(continuación)

SEQ ID NO: 23	VH 025, CDR1	GGSFSDYY
SEQ ID NO: 24	VH 025, CDR2	IHHSGST
SEQ ID NO: 25	VH 025, CDR3	ARGYYDSGVYYFDY
SEQ ID NO: 26	VL 025	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLRSGVPSRFSGSGSGDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 27	VL 025, CDR1	QGISRW
	VL 025, CDR2	AAS
SEQ ID NO: 28	VL 025, CDR3	QQYNSYPIT
SEQ ID NO: 29	VH 091	QVQLQQWAGALLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWT WIRQPPGKGLEWIGEIYHSGDTNYPNPSLKSRTISVD TSKNQFSLKLYSVTAADTAVYYCARLYFGSGIYYLDY WGQGTLLVTVSS
SEQ ID NO: 30	VH 091, CDR1	GGSFSGYY
SEQ ID NO: 163	VH 091, CDR2	IYHSGDT
SEQ ID NO: 31	VH 091, CDR3	ARLYFGSGIYYLDY
SEQ ID NO: 32	VL 091	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 33	VL 091, CDR1	QGISSW
	VL 091, CDR2	AAS
SEQ ID NO: 34	VL 091, CDR3	QQYNSFPPT
SEQ ID NO: 35	VH 129	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFSTFAIHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGGHKFYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARGLGVWGAFD YWQGTLLVTVSS
SEQ ID NO: 36	VH 129, CDR1	GFTFSTFA
SEQ ID NO: 37	VH 129, CDR2	ISYDGGHK
SEQ ID NO: 38	VH 129, CDR3	ARGLGVWGAFDY
SEQ ID NO: 39	VL 129	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWWTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 40	VL 129, CDR1	QSVSSY
	VL 129, CDR2	DAS
SEQ ID NO: 41	VL 129, CDR3	QQRSNWWT
SEQ ID NO: 42	VH 127	EVQLVQSGAEVKKKPGESLTISCKGSGYSFSIYWIGW VRQMPGKGLEWGMIIIFPGDSDIRYSPSFQGGQTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGDWSRPH WYFDLWGRGTLVTVSS
SEQ ID NO: 43	VH 127, CDR1	GYSFSIYW
SEQ ID NO: 44	VH 127, CDR2	IFPGSDSI

ES 2 733 921 T3

(continuación)

SEQ ID NO: 45	VH 127, CDR3	ARQPGDWSPRHWYFDL
SEQ ID NO: 46	VL 127	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGISSYLAWY QQKPGKAPELLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGDFTL TISYLSQSEDFATYYCQQYYSFPLTFGGGKTKVEIK
SEQ ID NO: 47	VL 127, CDR1	QGISSY
	VL 127, CDR2	AAS
SEQ ID NO: 48	VL 127, CDR3	QQYYSFPLT
SEQ ID NO: 49	VH 159	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGIYPGDSDFTRYSPSFQGGVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARWGTYDILTGYFN WFDPWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 50	VH 159, CDR1	GYNFTSYW
SEQ ID NO: 51	VH 159, CDR2	IYPGDSDF
SEQ ID NO: 52	VH 159, CDR3	ARWGTYDILTGYFN
SEQ ID NO: 53	VL 159	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYYIYPWTFGGGKTKVEIK
SEQ ID NO: 54	VL 159, CDR1	QGISSW
	VL 159, CDR2	AAS
SEQ ID NO: 55	VL 159, CDR3	QQYYIYPWT
SEQ ID NO: 56	VH 098	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSNYGMSW VRQAPGKGLEWVSAISGSAYSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLWLMNSLRAEDTAVYYCAKAHYHGSGSYY TLFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 57	VH 098, CDR1	GFTFSNYG
SEQ ID NO: 58	VH 098, CDR2	ISGSAYST
SEQ ID NO: 59	VH 098, CDR3	AKAHYHGSGSYYTLFDY
SEQ ID NO: 60	VL 098	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGGGKTKLEIK
SEQ ID NO: 61	VL 098, CDR1	QGISSW
	VL 098, CDR2	AAS
SEQ ID NO: 62	VL 098, CDR3	QQYNSYPYT
SEQ ID NO: 63	VH 153	QVQLVESGGGVVQPGRSLRSLSCAASGFTFSYDIHW VRQAPGKGLEWVTVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSAEDTAMYCARGGITGTTGVF DYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 64	VH 153, CDR1	GFTFSYDIW
SEQ ID NO: 65	VH 153, CDR2	ISYDGSNK
SEQ ID NO: 66	VH 153, CDR3	ARGGITGTTGVFDY

(continuación)

SEQ ID NO: 67	VL 153	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFRSGSGYGTDFSL TISSLQPEDFAIYYCQQYKSYIPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 68	VL 153, CDR1	QGISSW
	VL 153, CDR2	DAS
SEQ ID NO: 69	VL 153, CDR3	QQYKSYIPIT
SEQ ID NO: 70	VH 132	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISW VRQAPGGGLEWMGWISAYNGNSNYVQKFQGRVTM TTDTTSTAYMELRSLTSDDTAVYYCAREYSYDSGT FYYGMDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 71	VH 132, CDR1	GYTFTSYG
SEQ ID NO: 72	VH 132, CDR2	ISAYNGNS
SEQ ID NO: 73	VH 132, CDR3	AREYSYDSGTIFYFGM DV
SEQ ID NO: 74	VL 132	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPMYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 75	VL 132, CDR1	QSVSSY
	VL 132, CDR2	DAS
SEQ ID NO: 76	VL 132, CDR3	QQRSNWPMYT

Tabla 2: Homologías de secuencia de origen de ratón y de cadena pesada y ligera de HuMab seleccionados.

HuMab:	Ratón:	Cepa:	VH de línea germinal:	VL de línea germinal:
169	361494	HCo20	IgHV1-18-01	IgKV3-11-01
050	350633	HCo12	IgHV3-23-01	IgKV1-12-01
084	350615	HCo12-BalbC	IgHV1-69-04	IgKV1-12-01
025	350631	HCo12	IgHV4-34-01	IgKV1D-16-01
091	350630	HCo12	IgHV4-34-01	IgKV1D-16-01
129	359783	HCo12-BalbC	IgHV3-30-3-01	IgKV3-11-01
127	359783	HCo12-BalbC	IgHV5-51-01	IgKV1D-8-01
159	363503	HCo12	IgHV5-51-01	IgKV1D-16-01
098	350659	HCo17	IgHV3-23-01	IgKV1D-16-01
153	359785	HCo12-BalbC	IgHV3-30-3-01	IgKV1D-16-01
132	361487	HCo20	IgHV1-18-01	IgKV3-11-01

Tabla 3: Secuencias de la región variable de cadena pesada (VH), región variable de cadena ligera (VL) de los HuMab 049, 051, 055, 123, 161, 124, 001, 143, 019, 021, 027, 032, 035, 036, 054, 094. Las CDR respectivas se corresponden con las subrayadas en las Figuras 1 y 2, para las secuencias de VH y VL, respectivamente.

SEQ ID NO: 77	VH 049	EVQLLES GGDLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGRG GTTYADSVKGRFTISR DN SKSTLCLQ MNS LRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 78	VL 049	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQH KPGK APKLLIYAASILQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLR PEDFATYY CQQANSFPITFGQGTRLEIK

(continuación)

SEQ ID NO: 79	VH 051	EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGRGGTTYADSVKGRFTISRDNKSTLCLQMNS LRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 80	VL 051	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQHKPGK APKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLRPEDFATYY CQQANSFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 81	VH 055	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWWVRQAPG KGLEWVSAISGRGGTTYADSVKGRFTISRDNKSTLCLQMNS LRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 82	VL 055	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQHKPGK APKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLRPEDFATYY CQQANSFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 83	VH 123	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAAGYTFTNYGISWVRQAPG QALEWWMGWITTYSSNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARDRVVVRPDYFDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 84	VL 123	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSHWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 85	VH 161	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPG QGLEWWMGWSAYSNGNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELR SLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 86	VL 161	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 87	VH 124	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAAGYTFTNYGISWVRQAPG QGLEWWMGWITTYNGNTIYAQRFQDRVITMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 88	VL 124	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 89	VH 001	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWNWIRQPPG KGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSST AADTAVYYCARGNYGSGYFFDLWGRGTQVTVSS
SEQ ID NO: 90	VL 001	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIFAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLRPEDFATYY CQQYISFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 91	VH 143	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHSANSYNPMSLMSRVITISVDTSKNQFSLQLSSV TAADTAVYYCARGYYGSGYFFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 92	VL 143	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLRPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK

ES 2 733 921 T3

(continuación)

SEQ ID NO: 93	VH 019	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPG KGLEWIGEIHVHVGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGYYDSGVVYFDYWAQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 94	VL 019	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 95	VH 021	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHSNSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGYYASGVVYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 96	VL 021	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 97	VH 027	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYFWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHSNSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLNLSSVT AADTAVYYCARLIGSGYVYFDYWDQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 98	VL 027	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 99	VH 032	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGDTNYPNPSLTSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLFYGSYVYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 100	VL 032	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 101	VH 035	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGDTNYPNPSLTSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLFYGSYVYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 102	VL 035	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 103	VH 036	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLYYSGTYVYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 104	VL 036	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLTWYQQKPEKA PKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 105	VH 054	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIHHSNSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLWYGSYVYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 106	VL 054	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGGQGTKVEIK

ES 2 733 921 T3

(continuación)

SEQ ID NO: 107	VH 094	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWTWIRQPPG KGLEWIGEIYHSGDTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLYSVT AADTAVYYCARLYFGSGIYYLDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 108	VL 094	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLWVYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGQGKVEIK
SEQ ID NO: 109	VH 105	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSAYSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLWLQMNS LRAEDTAVYYCAKAHYHSGSYTLFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 110	VL 105	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPYTFGQGKLEIK
SEQ ID NO: 111	VH 100	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNGMNWVRQAPG KGLEWVSAISGTGYSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKAHYFGSGSYTLFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 112	VL 100	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPYTFGQGKLEIK
SEQ ID NO: 113	VH 125	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMNWRQAPG KGLEWVSTISGSGYATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKGHTLGSGSYTLFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 114	VL 125	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPYTFGQGKLEIK
SEQ ID NO: 115	VH 162	EVQLWESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAP GKLEWVSGISGSGYSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGYYHSGSYTSFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 116	VL 162	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPLTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 117	VH 033	QVQLVESGGGVVQTGRSLRLSCAASGFTFSSHAMHWVRQAPG KGLEWVA AISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGDYISSGVFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 118	VL 033	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGRLEIK
SEQ ID NO: 119	VH 160	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSHAMHWVRQAPG KGLEWVA AISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMN SLRAEDTAMCYCARGSITGSTGVFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 120	VL 160	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGRLEIK

(continuación)

SEQ ID NO: 121	VH 166	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNEYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGSIIGSTGVFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 122	VL 166	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPEK APKSLIYDASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 123	VH 152	QVQVVESSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSYKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGSITGSTGVFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 124	VL 152	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPEK APKSLIYDASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPENFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 125	VH 167	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGSITGSTGVFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 126	VL 167	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPEK APKSLIYDASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK

Tabla 4: CDR de consenso basadas en los alineamientos de secuencia que se muestran en las Figuras 1 y 2.

SEQ ID NO: 9 050-049-051-055	IgHV3-23-1	VH CDR1	GFTFSSYA	
SEQ ID NO: 127 050-049-051-055	IgHV3-23-1	VH CDR2	ISGX1GGX2T	Donde X1=R o S, y X2=T o S; preferentemente, donde X1=R y X2=T
SEQ ID NO: 11 050-049-051-055	IgHV3-23-1	VH CDR3	AKARANWDYFDY	
SEQ ID NO: 128 084	IgHV1-69-04	VH CDR1	GGTFX1X2YA	Donde X1=R o S, y X2=T o S; preferentemente, donde X1=R y X2=T
SEQ ID NO: 129 084	IgHV1-69-04	VH CDR2	IX2X3X3LGIX4	Donde X1=N o I, X2=T o P, X3=V o I, y X4=V o A, preferentemente, donde X1=N, X2=T, X3=V, y X4=V
SEQ ID NO: 130 084	IgHV1-69-04	VH CDR3	AREKGVDDYYG1X2	Donde X1=I o M, X2=E o D; preferentemente, donde X1=I, X2=E
SEQ ID NO: 131 169-123-161-124	IgHV1-18-1	VH CDR1	GYTFTXYG	Donde X=N o S, preferentemente N

(continuación)

SEQ ID NO: 132 169-123-161-124	IgHV1-18-1	VH CDR2	IX1X2YX3GNT	Donde X1=S, T, o I; X2=A o T; X3=S o N; preferentemente, donde X1=S, X2=A, y X3=S
SEQ ID NO: 133 169-123-161-124	IgHV1-18-1	VH CDR3	ARDRX1X2VRPDYFDY	Donde X1=I o V, X2=V o I; preferentemente, donde X1=I y X2=V
SEQ ID NO: 134 025-001-143-019-021-027	IgHV4-34-01	VH CDR1	GGFSX1YX2	Donde X1=D o G y X2=Y o F; preferentemente, donde X1=D y X2=Y
SEQ ID NO: 135 025-001-143-019-021-027	IgHV4-34-01	VH CDR2	IX1HX2GSX3	Donde X1=H o N, X2=S o V, y X3=T o A; preferentemente, donde X1=H, X2=S, y X3=T
SEQ ID NO: 136 025-001-143-019-021-027	IgHV4-34-01	VH CDR3	ARGX1X2X3SGX4YYFDX5	Donde X1=Y, N o L; X2=Y o I, X3=D, G o A; X4=V o Y; y X5=Y o L; preferentemente, donde X1=Y, X2=Y, X3=D, X4=V, y X5=Y
SEQ ID NO: 137 091-032-035-036-054-094	IgHV4-34-01	VH CDR1	GGFSX1YY	Donde X1=G o D, preferentemente G
SEQ ID NO: 138 091-032-035-036-054-094	IgHV4-34-01	VH CDR2	IX1HSGX2T	Donde X1=Y, N o H; y X2=D o S; preferentemente, donde X1=Y y X2=D
SEQ ID NO: 139 091-032-035-036-054-094	IgHV4-34-01	VH CDR3	ARLX1X2GSGX3YYX4DY	Donde X1=Y, F o W; X2=F o Y; X3=I, T o S; y X4=L o F; preferentemente, donde X1=Y, X2=F, X3=I, y X4=L
SEQ ID NO: 140 129	IgHV3-30-01	VH CDR1	GFTFSX1X2A	Donde X1=T o F, X2=F o Y; preferentemente, donde X1=T y X2=F

ES 2 733 921 T3

(continuación)

SEQ ID NO: 141 129	IgHV3-30-01	VH CDR2	ISYDGX1X2K	Donde X1=G o S, X2=H o N; preferentemente, donde X1=G y X2=H
SEQ ID NO: 142 129	IgHV3-30-01	VH CDR3	ARGLGVWGX1FDY	Donde X1=A o Y, preferentemente A
SEQ ID NO: 143 098-105-100-125-162	IgHV3-23-01	VH CDR1	GFTFX1X2YX3	Donde X1=S, N o T; X2=N, D o S; y X3=G o A; preferentemente, donde X1=S, X2=N y X3=G
SEQ ID NO: 144 098-105-100-125-162	IgHV3-23-01	VH CDR2	ISGX1X2X3X4T	Donde X1=S o T, X2=A o G, X3=Y o G, X4=S o A; preferentemente, donde X1=S, X2=A, X3=Y, X4=S
SEQ ID NO: 145 098-105-100-125-162	IgHV3-23-01	VH CDR3	AKX1X2X3X4GSGSYTX5FDY	Donde X1=A o G; X2=H o Y; X3=Y o T; X4=H, For L; X5=L o S; preferentemente, donde X1=A; X2=H; X3=Y; X4=H; X5=L
SEQ ID NO: 146 127	IgHV5-51-01	VH CDR1	GYSFX1X2YW	Donde X1=S o T, X2=I o S; preferentemente, donde X1=S, X2=I
SEQ ID NO: 147 127	IgHV5-51-01	VH CDR2	IX1PGDSDX2	Donde X1=F o Y, X2=I o T; preferentemente, donde X1=F, X2=I
SEQ ID NO: 148 127	IgHV5-51-01	VH CDR3	ARQPGDWSPRHWFYDL	
SEQ ID NO: 149 159	IgHV5-51-01	VH CDR1	GYXFYSYW	Donde X=N o S, preferentemente N
SEQ ID NO: 51 159	IgHV5-51-01	VH CDR2	IYPGSDST	
SEQ ID NO: 52 159	IgHV5-51-01	VH CDR3	ARWGTYYDILTGYFN	
SEQ ID NO: 71 132	IgHV1-18-01	VH CDR1	GYTFTSYG	
SEQ ID NO: 150 132	IgHV1-18-01	VH CDR2	ISAYNGNX	Donde X=S o T, preferentemente S

ES 2 733 921 T3

(continuación)

SEQ ID NO: 151 132	IgHV1-18-01	VH CDR3	AREYSYDSGTYFFYGMDV	
SEQ ID NO: 152 153-033-160-166-152-167	IgHV3-30-03-01	VH CDR1	GFTFSX1X2X3	Donde X1=D o S, X2=Y o H, X3=V o A; preferentemente, donde X1=D, X2=Y, X3=V
SEQ ID NO: 153 153-033-160-166-152-167	IgHV3-30-03-01	VH CDR2	ISYDGSX1X2	Donde X1=N o Y, X2=K o E, preferentemente donde X1=N y X2=K
SEQ ID NO: 154 153-033-160-166-152-167	IgHV3-30-03-01	VH CDR3	ARGX1X2X3X4X5X6GX7FDY	Donde X1=G, D o S; X2=I o Y; X3=T o I; X4=G o S; X5=T o S; X6=T o S; X7=Y o V; preferentemente, donde X1=G; X2=I; X3=T; X4=G; X5=T; X6=T; y X7=V
SEQ ID NO: 13 050-084-049-051-055	IgKV1-12-01	VL CDR1	QGISSW	
050-084-049-051-055	IgKV1-12-01	VL CDR2	XAS	Donde X=A o V
SEQ ID NO: 155 050-084-049-051-055	IgKV1-12-01	VL CDR3	QQANSFPXT	Donde X=I o L
SEQ ID NO: 6 169-124-161-123	IgKV3-11-01	VL CDR1	QSVSSY	
169-124-161-123	IgKV3-11-01	VL CDR2	DXS	Donde X=A o T, preferentemente A
SEQ ID NO: 156 169-124-161-123	IgKV3-11-01	VL CDR3	QQRSXWPRT	Donde X=N o H, preferentemente N
SEQ ID NO: 157 025-001-019-143-021-027	IgKV1D-16-01	VL CDR1	QGISXW	Donde X=R o S, preferentemente R
025-001-019-143-021-027	IgKV1D-16-01	VL CDR2	AAS	
SEQ ID NO: 164 025-001-019-143-021-027	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYNSXPIT	Donde X=Y o F, preferentemente Y
SEQ ID NO: 33 091-032-035-036-054-094	IgKV1D-16-01	VL CDR1	QGISSW	
091-032-035-036-054-094	IgKV1D-16-01	VL CDR2	AX1X2	Donde X1=A o T, y X2=S o F; preferentemente, donde X1=A y X2=S
SEQ ID NO: 158 091-032-035-036-054-094	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYNSFPPT	

(continuación)

SEQ ID NO: 159 098-100-105-125-162	IgKV1D-16-01	VL CDR1	QGIXSW	Donde X=S o N, preferentemente S
098-100-105-125-162	IgKV1D-16-01	VL CDR2	AAS	
SEQ ID NO: 160 098-100-105-125-162	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYNSYPXT	Donde X=Y o L, preferentemente Y
SEQ ID NO: 161 153-152-166-167-160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR1	QGIX1X2W	Donde X1=S o N; X2=S o N; preferentemente, donde X1=X2=S
153-152-166-167-160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR2	XAS	Donde X=D o A, preferentemente D
SEQ ID NO: 162 153-152-166-167-160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYXSYPT	Donde X=K o N, preferentemente K

Ejemplo 11 - Purificación de anticuerpos

5 El sobrenadante del cultivo se filtró en filtros sin salida de 0,2 mm, se cargó en columnas MabSelect SuRe de 5 ml (GE Health Care) y se eluyeron con 0,1 M de citrato sódico-NaOH, pH 3. El eluido se neutralizó inmediatamente con 2 M de Tris-HCl, pH 9 y se dializó durante una noche con 12,6 mM de NaH₂PO₄, 140 mM de NaCl, pH 7,4 (B. Braun). De manera alternativa, posteriormente a la purificación, el eluido se cargó en una columna HiPrep de desalado y el anticuerpo se intercambió en un tampón de 12,6 mM de NaH₂PO₄, 140 mM de NaCl, pH 7,4 (B. Braun). Después de la diálisis o el intercambio de tampón, las muestras se esterilizaron por filtración en filtros sin salida de 0,2 mm. Se determinó la pureza por SDS-PAGE y se midió la concentración por nefelometría y absorbancia a 280 nm. Los anticuerpos purificados se almacenaron a 4 °C. Se llevó a cabo la espectrometría de masas para identificar la masa molecular de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo expresadas por los hibridomas como se ha descrito en el Ejemplo 9.

15 Ejemplo 12 - Unión de clones HER2 a células tumorales que expresan HER2 unido a su membrana medida mediante análisis FACS

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

30 Como se muestra en la Figura 3 todos los anticuerpos HER2 ensayados se unían al HER2 expresado en las células AU565 y A431 de una manera dependiente de la dosis. Los valores de la CE₅₀ para la unión variaban entre 0,336-2,290 µg/ml para las células AU565 y 0,068-1,135 µg/ml para las células A431. Especialmente en las células A431 se observaron grandes diferencias en los valores de la CE₅₀ entre los anticuerpos ensayados. Sin embargo, el anticuerpo 098 tenía el mejor (es decir, el menor) valor de CE₅₀ en ambos tipos de células. También se observaron algunas diferencias en los niveles máximos de unión entre los diferentes anticuerpos, en ambas células AU565 y A431. De los anticuerpos ensayados, el anticuerpo 098 también tenía el nivel de unión máxima más alto en las células AU565, mientras que el anticuerpo 025 tenía el nivel de unión máxima más alto en las células A431.

Ejemplo 13 - Unión de anticuerpos HER2 a células tumorales que expresan HER2 unido a su membrana que se expresan en células epiteliales de Rhesus medida mediante análisis FACS

40 Para determinar la reactividad cruzada con HER2 de Rhesus, se ensayó la unión de los anticuerpos HER2 a células epiteliales de Rhesus positivas a HER2 (4MBr-5 adquiridas en la ATCC) utilizando citometría de flujo (FACS Canto II, BD Biosciences). Se utilizó como conjugado secundario un anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado con Ficoeritrina (Jackson). Se utilizó un isotipo de anticuerpo de control como anticuerpos de control negativo.

45 Como se muestra en la Figura 4, todos los anticuerpos HER2 ensayados eran reactivos de manera cruzada con el

HER2 de mono Rhesus. A ambas concentraciones (1 µg/ml y 10 µg/ml), los anticuerpos HER2 eran capaces de unirse específicamente al HER2 de mono Rhesus. El anticuerpo 127 mostraba una mala unión a la concentración de 1 µg/ml, pero mostraba una buena unión a una concentración de 10 µg/ml. El anticuerpo 098 tenía el nivel de unión más alto con ambas concentraciones de anticuerpo. No se observó ninguna unión con el isotipo de anticuerpo de control.

Ejemplo 14 - Competición de anticuerpos HER2 por la unión a Her2ECDHis medida en un ELISA sándwich

Las concentraciones de revestimiento óptimas de los anticuerpos HER2 ensayados y la concentración óptima de Her2ECDHis se determinaron de la siguiente manera: Los pocillos del ELISA se revistieron durante una noche a 4 °C con los HuMab HER2 diluidos en serie en PBS (0,125-8 µg/ml en diluciones de 2 veces). A continuación, los pocillos del ELISA se lavaron con PBST (PBS suplementado con un 0,05 % de Tween-20 [Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos]) y se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente (TA) con PBSTC (PBST suplementado con un 2 % [v/v] con suero de pollo [Gibco, Paisley, Escocia]). Los pocillos del ELISA se lavaron entonces con PBST y se incubaron durante una hora a TA con Her2ECDHis diluido en serie en PBSTC (0,25-2 µg/ml en diluciones de 2 veces). El Her2ECDHis no unido se retiró con un lavado de PBST, y el Her2ECDHis unido se incubó durante una hora a TA con 0,25 µg/ml de un anticuerpo de conejo anti-6xhis-biot (Abcam, Cambridge, RU). La placa se lavó a continuación con PBST y se incubó durante una hora con 0,1 µg/ml de Estreptavidina-poli-HRP (Sanquin, Amsterdam, Países Bajos) diluida en PBST. Después del lavado, se visualizó la reacción mediante una incubación de 15 minutos con ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS: una pastilla de ABTS diluida en 50 ml de tampón ABTS (Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos) a TA protegida de la luz. La coloración se paró añadiendo un volumen igual de ácido oxálico (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). Se midió la fluorescencia 405 nm en un lector de placas de microtitulación (Biotek Instruments, Winooski, USA). Las concentraciones de anticuerpo que daban como resultado una unión subóptima de cada anticuerpo, se determinaron y utilizaron para los siguientes experimentos de bloqueo cruzado.

Cada anticuerpo HER2 revestía los pocillos de ELISA a la dosis subóptima que se determinó como se ha descrito anteriormente. Después del bloqueo de los pocillos del 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 lleva a cabo entonces como se ha descrito anteriormente. La unión residual del Her2ECDHis al anticuerpo de revestimiento se expresó como un porcentaje relativo a la unión observada en ausencia de un anticuerpo competidor. El porcentaje de competición se determinó entonces como 100 menos el porcentaje de inhibición. El 75 % de competición se consideró como el bloqueo cruzado completo, mientras que el 25-74 % de competición se consideró como bloqueo cruzado parcial, y del 0-24 % de competición se consideró no bloqueante.

Como se muestra en la Tabla 5, se descubrió que todos los anticuerpos HER2 eran capaces de bloquear el Her2ECDHis, al menos parcialmente, por sí mismos. Después de dividir los anticuerpos en 3 grupos principales de bloqueo cruzado, todos los anticuerpos se ensayaron en cuanto a competición con al menos un anticuerpo representativo de cada grupo.

El primer grupo comprendía trastuzumab y los anticuerpos 169, 050 y 084, que se bloqueaban entre ellos en la unión al Her2ECDHis, pero no bloqueaban los anticuerpos de otros grupos.

El segundo grupo comprendía pertuzumab y los anticuerpos 025, 091 y 129, que se bloqueaban entre ellos en la unión a Her2ECDHis, excepto los anticuerpos 129 y 091 que bloqueaban de manera cruzada al pertuzumab y el 025, pero no entre ellos. Ninguno de los anticuerpos del grupo 2 bloqueaba anticuerpos de otros grupos.

Un tercer grupo comprendía los anticuerpos C1, F5, 127, 098, 132, 153 y 159, que no bloquean de manera cruzada ningún anticuerpo de los otros grupos. En este grupo 3, se observó alguna variación. El anticuerpo 127 era el único anticuerpo que era capaz de bloquear de manera cruzada todos los demás anticuerpos en este grupo en la unión a Her2ECDHis; el anticuerpo 159 bloqueaba de manera cruzada todos los otros anticuerpos dentro de esta grupo, excepto el 132; el clon 098 bloqueaba de manera cruzada todos los anticuerpos del grupo 3, excepto el 132 y 153; el anticuerpo 153 bloqueaba de manera cruzada el 127, 132 y 159 en la unión a Her2ECDHis, pero no el 098, C1, o F5; el clon 132 bloqueaba de manera cruzada el 127, 132 y 153. Cuando se añadían como anticuerpos competidores, solamente F5 y C1 presentaban un bloqueo cruzado entre ellos. Sin embargo, la reacción inversa también reveló una competición con los anticuerpos 127, 098 y 159 pero no el 153 y 132. Posiblemente, estas diferencias pueden resultar de menores afinidades de los anticuerpos C1 y F5 para el Her2ECDHis.

Los valores mayores del 100 % se pueden explicar por los efectos de la avidéz y la formación de complejos anticuerpo-Her2ECDHis que contenían dos anticuerpos no competidores.

Tabla 5: Competición y bloqueo cruzado de anticuerpos HER2 por la unión a Her2ECDHis

mAb inmovilizado ↓	mAb de competición →														
	tras	169	050	084	pert	025	091	129	C1	F5	127	159	098	153	132
Trastuzumab	6	15	6	51	100	107	100	85	103	99	115	90	101	101	101
TH1014-169	19	45	21	73	101	98	105	106	ND	ND	ND	ND	105	102	ND
TH1014-050	13	30	12	74	95	104	98	110	ND	ND	ND	ND	102	104	ND
TH1014-084	74	73	76	20	101	106	104	104	ND	ND	ND	ND	109	98	ND
TH1014-pert	104	100	94	95	9	20	19	39	106	125	116	81	103	100	109
TH1014-025	98	98	100	104	8	18	21	15	ND	ND	ND	ND	102	99	ND
TH1014-091	99	99	95	100	5	13	15	78	ND	ND	ND	ND	98	98	ND
TH1014-129	93	99	97	92	22	55	76	12	ND	ND	ND	ND	106	98	ND
TH1014-C1	89	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	65	58	73	53	58	77	90
TH1014-F5	197	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70	21	62	15	16	80	125
TH1014-127	102	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	112	88	11	8	58	21	44
TH1014-159	111	ND	ND	ND	112	ND	ND	ND	96	86	15	6	11	40	79

TH1014-098	107	102	100	103	104	108	104	107	125	96	21	9	17	110	142
TH1014-153	134	111	103	107	121	97	102	106	257	96	27	23	115	28	33
TH1014-132	353	ND	ND	ND	288	ND	ND	ND	422	379	30	131	309	41	32
Grupo de cruce de bloques	1	1	1	1	2	2	2	2b	3a	3a	3a	3a	3a	3b	3b

75 - 100% competición

25 - 74% competición

0 - 24% competición

5 Los valores representados son porcentajes medios de unión con respecto a la unión observada en ausencia de anticuerpo competidor, de dos experimentos independientes. Los experimentos de competición con TH1014-C1 y TH1014-F5 producidos en HEK se llevaron a cabo una vez. El trastuzumab (Herceptin® de calidad clínica) y el pertuzumab (TH1014-pert) producidos en HEK también se ensayaron.

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

10 Se recolectaron células SK-BR-3 (adquiridas en la ATCC, HTB-30) (5×10^6 células), se lavaron (dos veces en PBS, 1500 rpm, 5 min) y se recolectaron en 1 ml de medio RPMI 1640 suplementado con un 10 % de suero bovino cósmico (CCS) (HyClone, Logan, UT, USA), al que se añadieron $200 \mu\text{Ci Cr}^{51}$ (Cromo-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, Países Bajos). La mezcla se incubó en un baño de agua agitada durante 1,5 horas a 37

15 °C. después del lavado de las células (dos veces en PBS, 1500 rpm, 5 min), las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con un 10 % de CCS, se contó por exclusión de azul tripan y se diluyó a una concentración de 1×10^5 células/ml.

20 Entre tanto, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de capas leucocitarias recientes (Sanquin, Amsterdam, Países Bajos) utilizando una centrifugación de densidad Ficoll convencional de acuerdo con las instrucciones del fabricante (medio de separación de linfocitos; Lonza, Verviers, Francia). Después de la resuspensión de células en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % CCS, se contaron las células por exclusión en azul tripano y se concentraron a 1×10^7 células/ml.

25 Se produjo trastuzumab en células CHO que resultó en un (aumento) grado de fucosilación no central del 12,4 % mientras que los otros anticuerpos HER2 se produjeron en células HEK, dando como resultado una media del 4 % de fucosilación no central.

30 Para el experimento de ADCC, se preincubaron 50 μl de células SK-BR-3 (5.000 células) marcadas con Cr^{51} con 15 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo HER2 (IgG1, κ) en un volumen total de 100 μl de medio RPMI suplementado con un 10 % de

CCS en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después de 15 min a TA, se añadieron 50 µl de PBMC (500.000 células), dando como resultado una relación de efector respecto a diana de 100:1. La cantidad máxima de lisis celular se determinó incubando 50 µl de células SK-BR-3 (5000 células) marcadas con Cr⁵¹ con 100 µl de Triton-X100 al 5 %. La cantidad de lisis espontánea se determinó incubando 5000 células SK-BR-3 marcadas con Cr⁵¹ en 150 µl de medio, sin ningún anticuerpo o células efectoras. El nivel de lisis celular independiente de anticuerpo se determinó incubando 5000 células SK-BR-3 con 500.000 PBMC sin anticuerpo. Posteriormente, las células se incubaron 4 h a 37 °C, un 5 % de CO₂. Para determinar la cantidad de lisis celular, las células se centrifugaron (1200 rpm, 3 min) y 75 µl de sobrenadante se transfirió a tubos micronic, después de lo cual se hizo un recuento del Cr⁵¹ liberado utilizando un contador gamma. Los recuentos medidos por minuto (cpm) se utilizaron para calcular el porcentaje de lisis mediada por anticuerpo de la siguiente manera:

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

Como se muestra en la Figura 5, los anticuerpos HER2 de los grupos de bloqueo cruzado 1 y 2 inducían una lisis eficaz de las células SK-BR-3 mediante ADCC. Del grupo 3, el anticuerpo 153 era el único anticuerpo que inducía una ADCC eficaz, el anticuerpo 132 inducía aproximadamente un 10 % de ADCC, y los clones 098, 159 y 127 no inducían ADCC.

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

Los anticuerpos HER2 se ensayaron en cuanto a 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 células como se describe en el Ejemplo 12), el HER2 es constitutivamente activo en estas células y por lo tanto no depende de la heterodimerización inducida por el ligando.

En una placa de cultivo tisular de 96 pocillos (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania), se sembraron 9000 células AU565 por pocillo en presencia de 10 µg/ml de anticuerpo HER2 en medio de cultivo celular libre de suero. Como control, se sembraron las células en medio libre de suero sin anticuerpo. Después de 3 días, se cuantificó la cantidad de células viables como azul alamar (BioSource International, San Francisco, US) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se controló la fluorescencia utilizando el lector EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlandia) con los ajustes de azul alamar convencionales. La señal de azul alamar de las células tratadas con anticuerpo se representó como un porcentaje relativo de células sin tratar. Se aplicó el ensayo de Dunnett para los análisis estadísticos.

Los resultados se muestran en la Figura 6, que representa el porcentaje de proliferación de células AU565 después del tratamiento con anticuerpo HER2 en comparación con las células sin tratar, que se fijó en el 100 %. De los anticuerpos del Grupo 1 ensayado, el trastuzumab, 050 y 169 presentaban una inhibición significativa de la proliferación de células AU565 (P<0,05) mientras que el 084 no tenía efecto. Ninguno de los anticuerpos ensayados del Grupo 2 (Pertuzumab, 025, 092 y 129) eran capaces de inhibir la proliferación de células AU565. Los anticuerpos ensayados del grupo 3 (098 y 153) no inhibían la proliferación de AU565. Por el contrario, ambos anticuerpos inducían el aumento de proliferación de células AU565 en comparación con las células sin tratar (098 más que 153). El aumento de proliferación puede ser una ventaja en algunas aplicaciones terapéuticas de conjugados ADC, por ejemplo, cuando la acción citotóxica del fármaco se basa, o aumenta por, la proliferación celular. Para el trastuzumab y el pertuzumab, estaba de acuerdo con los resultados descritos por Juntilla et al. (Cancer Cell 2009; 15(5):353-355).

Ejemplo 17 - Inhibición de la proliferación de células MCF-7 inducida por ligando

Como el HER2 es un receptor huérfano, su señalización es dependiente principalmente de la activación de otros miembros de la familia ErbB tales como EGFR y Her3. Al unirse al ligando, estos dos receptores se pueden unir y activar el receptor HER2, dando como resultado, por ejemplo, la proliferación. Distintas publicaciones describen que el pertuzumab inhibe eficazmente la proliferación inducida por Heregulina-β1 (Franklin MC. Cancer Cell 2004 / Landgraf R. BCR 2007). Para el trastuzumab, se había descrito que tiene poco efecto sobre la heterodimerización HER2/HER3 inducida por Heregulina-β1 y la proliferación (Larsen SS., et al., Breast Cancer Res Treat 2000;58:41-56; Agus DB., et al., Cancer Cell 2002;2:127-137; Wehrman et al. (2006), *supra*).

Para investigar la capacidad de los presentes anticuerpos HER2 humanos para interferir con los heterodímeros HER2/HER3 inducidos por Heregulina-β1, se llevó a cabo un ensayo de proliferación inducida por Heregulina-β1. Por lo tanto, se sembraron células MCF7 (adquiridas en ATCC HTB-22) que expresaban ~20.000 moléculas de HER2 por células en una placad de cultivo tisular de 96 pocillos (Greiner bio-one) (2.500 células/pocillo) en medio de cultivo celular completo. Después de 4 horas, el medio de cultivo celular se reemplazó con un medio de privación que contenía un 1 % de suero bovino Cosmic (CCS) y 10 µg/ml de anticuerpo HER2. A continuación, se añadió la Heregulina-β1 (PeproTech, Princeton Business Park, US) diluida en un medio de privación que contenía un 1 % de CCS a los pocillos a una concentración final de 1,5 ng/ml. Después de 4 días, se cuantificó la cantidad de células viables como azul alamar (BioSource International) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se controló la

fluorescencia utilizando el lector EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer) con los ajustes de azul alamar convencionales. La señal de azul alamar de las células inducidas con ligando tratadas con el anticuerpo HER2 se representó como un porcentaje de señal en comparación con las células inducidas por ligando incubadas sin el anticuerpo HER2. Se aplicó el ensayo de Dunnett para los análisis estadísticos.

5 La Figura 7 muestra el porcentaje de células MCF7 viables estimuladas con Heregulina- β 1 y tratadas con el anticuerpo HER2 indicado, con respecto a las células viables después de la estimulación con Heregulina- β 1 en ausencia del anticuerpo HER2, que se fijó en el 100 %. La proliferación de MCF-7 en ausencia de Heregulina- β 1 y anticuerpo también se representó (ninguno). Los anticuerpos 025, 091, 129, 153 y pertuzumab (TH1014-pert) 10 demostró la inhibición significativa de la proliferación de MCF-7 inducida por Heregulina- β 1 ($P < 0,05$). También el trastuzumab presentaba alguna inhibición de proliferación de células MCF-7 inducida por Heregulina- β 1, aunque no tan eficazmente que otros anticuerpos HER2 ensayados. Se había informado que el dominio IV de HER2 está implicado en la estabilización de heterodímeros EGFR/HER2, pero sin detalles en su contribución a los heterodímeros HER2/HER3 (Wehrman et al., *supra*). Los anticuerpos 050, 084, 169 y 098 no tenían un efecto 15 estadísticamente significativo sobre la proliferación de células MCF-7 inducida por Heregulina- β 1. Sin estar limitados por teoría alguna, esto sugiere que estos anticuerpos no inhiben la heterodimerización de HER2/HER3 inducida por ligando.

20 Ejemplo 18 - Ensayo anti-kappa-ETA'

Para investigar la idoneidad de los anticuerpos HER2 para una estrategia de conjugado anticuerpo-fármaco, se desarrolló un ensayo genérico *in vitro* de lisis basado en células utilizando la exotoxina A de pseudomonas dirigida a kappa (anti-kappa-ETA'). El ensayo utiliza un anticuerpo con un dominio anti-kappa de alta afinidad conjugado con una forma truncada de exotoxina A de pseudomonas. Al internalizarse, el anticuerpo con el dominio anti-kappa ETA' 25 sufre una proteólisis y la reducción del enlace disulfuro, separando el dominio catalítico del dominio de unión. El dominio catalítico se transporta desde el aparato de Golgi hacia el retículo endoplásmico mediante el motivo de retención KDEL, y posteriormente se transloca al citosol donde inhibe la síntesis proteica e induce apoptosis (ref. Kreitman RJ. *BioDrugs* 2009;23(1):1-13). En este ensayo, para identificar los anticuerpos HER2 que son capaces de internalizarse y destruir mediante la toxina, se preconjugaron los anticuerpos HER2 con el anti-kappa-ETA' antes de 30 la incubación con células positivas a HER2.

Primero, se determinó la concentración óptima de anti-kappa-ETA' para cada línea celular, es decir, la dosis máxima tolerada que no da lugar a la inducción de muerte 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 tisular de 96 pocillos (Greiner bio-one) y se les permitió que se adhirieran durante al menos 4 horas. A continuación, se 35 incubaron las células con diluciones de 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 y 0 μ g/ml de anti-kappa-ETA' en un medio de cultivo celular normal. Después de 3 días, se cuantificó la cantidad de células viables con azul alamar (BioSource International, San Francisco, US) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se controló la fluorescencia utilizando el lector EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlandia) con los ajustes de azul alamar 40 convencionales. La mayor concentración de anti-kappa-ETA' que no destruía las células por sí misma se utilizó para los siguientes experimentos (0,5 μ g/ml para AU565 y 1 μ g/ml para A431).

A continuación, se ensayó la internalización mediada por anticuerpo y la destrucción por la toxina para diferentes anticuerpos HER2. Las células se sembraron como se describió anteriormente. Las diluciones en serie de anticuerpos HER2 se preincubaron durante 30 minutos con la concentración predeterminada de anti-kappa-ETA' 45 antes de añadirlos a las células. Después de 3 días de incubación, la cantidad de células viables se cuantificó como se ha descrito anteriormente. La señal de azul alamar 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 μ g/ml de Estaurosporina como control positivo para la destrucción celular. Se utilizó un isotipo de anticuerpo de control 50 como control negativo.

Como se muestra en la Figura 8 A, B y la Tabla 6, todos los anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA' eran capaces de destruir las células AU565 de una manera dependiente de la dosis. Todos los anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA' ensayados demostraron que destruían mejor las células AU565 en comparación 55 con el trastuzumab conjugado con anti-kappa-ETA' y el pertuzumab conjugado con anti-kappa-ETA' (TH1014-pert). Además, el porcentaje de células AU565 destruidas era mayor para los anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA' (70,3 - 49,9 %) en comparación con trastuzumab conjugado con anti-kappa-ETA' (31,9 %) y pertuzumab conjugado con anti-kappa-ETA' (47,51 %) y los valores de la CE_{50} estaban aumentados. Los valores de la CE_{50} de los anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA' variaban entre 12,12 ng/ml y 46,49 ng/ml) en comparación 60 con los 78,49 ng/ml del trastuzumab conjugado con anti-kappa-ETA' y los 117,8 ng/ml para el pertuzumab conjugado con anti-kappa-ETA'. El anticuerpo 159 tenía el porcentaje más alto de destrucción celular, y el 098 la menor CE_{50} .

Tabla 6: Los datos que se muestran son los valores de la CE₅₀ y el porcentaje máximo de destrucción celular de células AU565 tratadas con los anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA', medidos en un experimento representativo. La destrucción celular inducida por Estauosporina se fijó en el 100 % y el MFI de células sin tratar se fijó en el 0 %. Ndet = no detectado.

anticuerpo	% células destruidas	CE50 ng/ml
PC1014-159	70,3	34,93
PC1014-127	69,0	34,46
PC1014-132	61,6	39,35
PC1014-129	60,8	30,85
PC1014-153	60,3	32,26
PC1014-025	60,0	16,71
PC1014-098	58,7	12,12
PC1014-084	58,1	26,97
PC1014-050	52,4	12,71
PC1014-091	50,6	46,49
PC1014-169	49,9	35,62
TH1014-pert	47,5	117,8
trastuzumab	31,9	78,49
Isotipo de control	Ndet	Ndet

5 Como se muestra en la Figura 8 C, D y la Tabla 7, los anticuerpos 025, 091, 098, 129 y 153 eran capaces de inducir una destrucción eficaz de células A431 (≥ 75 %). El porcentaje más alto de destrucción celular, y la CE₅₀ más baja los mostraba el anticuerpo 098. Cuando se conjugaba con anti-kappa-ETA' el trastuzumab y el anticuerpo de isotipo de control no inducía la destrucción de células A431. Los anticuerpos 169, 084 y pertuzumab inducían porcentajes de destrucción celular de no más de aproximadamente un 50 %. No se observó destrucción celular con los anticuerpos HER2 no conjugados.

10 **Tabla 7:** Los datos que se muestran son los valores de la CE₅₀ y el porcentaje máximo de destrucción celular de células A431 tratadas con los anticuerpos HER2 conjugados con anti-kappa-ETA', medidos en un experimento representativo. La destrucción celular inducida por Estauosporina se fijó en el 100 % y el MFI de células sin tratar se fijó en el 0 %. "NDet" significa no detectado.

anticuerpo	% células destruidas	CE50 ng/ml
PC1014-025	86,7	-9,77
PC1014-084	50,5	ND
PC1014-091	83,3	-9,86
PC1014-098	87,2	1,65
PC1014-129	75,9	-10,60
PC1014-153	82,4	-10,11
PC1014-169	34,0	ND
TH1014-pert	37,0	61,58
trastuzumab	Ndet	Ndet
Isotipo de control	NDet	NDet

Ejemplo 19 - Internalización de anticuerpos HER2 medida con un ensayo de fab-CypHer5E basado en FMAT

20 Para investigar si el aumento de destrucción de las células AU565 observado en el ensayo kappa-toxina-ETA' descrito en el Ejemplo previo se correlacionaba con el aumento de internalización de anticuerpos HER2, se llevó a cabo un ensayo de internalización basado en fab-CypHer5E. Cyp HER2 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 (pKa) de 7,3.

Las células AU565 se sembraron en placas de cultivo tisular de 384 pocillos (Greiner bio-one), a una densidad de 3000 células/pocillo en medio de cultivo celular normal suplementado con 240 ng/ml de fab-CypHer5E (se llevó a cabo la conjugación de Fab de cabra anti-IgG humana [Jackson] con CypHer5E [GE Healthcare, Eindhoven, Países Bajos] de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Ha continuación, se diluyeron en serie los anticuerpos HER2 en medio de cultivo celular normal, se añadió a las células y se dejó a temperatura ambiente durante 9 horas. Se midieron las intensidades de fluorescencia media (MFI) del CypHer5E intracelular utilizando un 8200 FMat (Applied Biosystems, Nieuwerkerk A/D IJssel, Países Bajos) y se utilizaron los 'recuentos x fluorescencia' como resultado de la lectura. Se utilizó un isotipo de anticuerpo de control como anticuerpos de control negativo. Se determinaron los valores de la CE₅₀ mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism V4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Los resultados se muestran en la Tabla 8, que representan la CE₅₀ y los valores de la MFI máxima para todos los anticuerpos HER2 ensayados en el ensayo de internalización CypHer5E con células AU565. Los valores de MFI máximos indican cuantos receptores HER2 se internalizan al unirse al anticuerpo. Todos los anticuerpos HER2 presentaban los valores de MFI máximos más altos (137.904 - 38.801) en comparación con el trastuzumab (35000) y pertuzumab (TH1014-pert) (32.366), indicando que los anticuerpos HER2 inducían un aumento de internalización del receptor. Notablemente, los anticuerpos que no compiten con el trastuzumab o HT1014-pert inducían más internalización del receptor en comparación con los anticuerpos que competían con el trastuzumab y HT1014-pert alcanzando la MFI más alta los anticuerpos 098 y 127. Sin quedar ligados por teoría alguna, esto puede ser inherente a una incapacidad de inhibir la heterodimerización del HER2.

Tabla 8: Ensayo de internalización de anticuerpos HER2 basado en Cypher-5. Los datos que se muestran son la MFI y CE₅₀ de un experimento significativo de dos experimentos con células AU565 tratadas con anticuerpos HER2 marcados con fab-CypHer5E. Algunos valores de la CE₅₀ no se pudieron calcular (ND).

Cypher 5		
Anticuerpo	CE ₅₀ ng/ml	MFI máxima
PC1014-025	30,05	63428
PC1014-091	32,99	50711
PC1014-129	7,15	60302
TH1014-pert	530	32366
PC1014-169	ND	38801
PC1014-084	30,51	71059
trastuzumab	21,70	35000
PC1014-098	13,77	134575
PC1014-127	~9,68	137904
PC1014-159	ND	92427
TH1014-F5	22,65	113116
PC1014-132	11,42	112270
PC1014-153	~14,91	87531

mAb que compiten con Herceptin

mAb que compiten con TH1014-pert

mAb que compiten con TH1014-F5

mAb no-compiten

Ejemplo 20: Generación de anticuerpos biespecíficos por intercambio de brazo Fab inducido por 2-MEA

Se describe un método *in vitro* para la preparación de anticuerpos biespecíficos en el documento WO 2008119353 (Genmab) y el publicado por van der Neut-Kolfschoten et al. (Science. 2007 Sep 14;317(5844):1554-7). En el presente documento, se forma un anticuerpo biespecífico mediante un intercambio de "brazo Fab" o "media molécula" (intercambio de una cadena pesada y la cadena ligera unida) entre dos anticuerpos tipo IgG4 o IgG4 mono-específicos al incubarse en condiciones moderadamente reductoras. La reacción de intercambio del brazo Fab es el resultado de una reacción de isomerización del enlace bisulfuro en el que los enlaces disulfuro entre cadenas pesadas en las regiones de bisagra de los anticuerpos mono-específicos se reducen y las cisteínas libres resultantes forman un nuevo enlace disulfuro entre las cadenas pesadas con los restos de cisteína de otra molécula de anticuerpo con una especificidad diferente. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab con diferentes secuencias.

En una nueva invención se adapta el conocimiento de este intercambio de brazo Fab de IgG4 natural para generar un método para la producción de anticuerpos biespecíficos estables basados en IgG1. El producto del anticuerpo biespecífico generado mediante este método descrito posteriormente no participará más en el intercambio de brazo Fab de IgG4. La base para este método es el uso de dominios CH3 complementarios, que promueven la formación de heterodímeros en condiciones de ensayo específicas. Para hacer posible la producción de anticuerpos biespecíficos mediante este método, se generaron moléculas de IgG1 que tienen ciertas mutaciones en el dominio CH3: en uno de los anticuerpos IgG1 parentales las mutaciones T350I, K370T y F405L, en el otro anticuerpo IgG1 parental la mutación K409R. Para generar los anticuerpos biespecíficos, estos dos anticuerpos parentales, cada anticuerpo con una concentración final de 0,5 mg/ml (concentración equimolar), se incubaron con 25 mM de 2-mercaptoetilamina-HCl (2-MEA) en un volumen total de 100 µl TE a 37 °C durante 90 min. La reacción de reducción se paró cuando el agente reductor 2-MEA se retiró utilizando columnas de centrifugación (Microcon centrifugal filters, 30k, Millipore) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Ejemplo 21 - Anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 ensayados en un ensayo de citotoxicidad *in vitro*

El ejemplo muestra que los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 pueden suministrar un agente citotóxico en las células tumorales después de la internalización en un ensayo genérico *in vitro* de destrucción basado en células utilizando exotoxina de *Pseudomonas* dirigida a kappa (anti-kappa-ETA'). Este ensayo utiliza un dominio de anticuerpo anti-kappa de alta afinidad conjugado con una forma truncada de la exotoxina A de *Pseudomonas*. Se habían hecho previamente proteínas de fusión similares de proteínas de unión al anticuerpo (motivo de unión a IgG de la proteína A o proteína G estreptocócica) y toxina diftérica o exotoxina A de *Pseudomonas* (Mazor Y. et al., J. Immunol. Methods 2007; 321:41-59); Kuo SR. et al., 2009 Bioconjugate Chem. 2009; 20:1975-1982). Estas moléculas al contrario que la anti-kappa-ETA' se unían a la parte Fc de anticuerpos completos. Con la internalización y clasificación endocítica el dominio de anticuerpos anti-kappa-ETA' se somete a proteólisis y reducción de enlaces disulfuro, separando el dominio catalítico del dominio de unión. El dominio catalítico se transporta entonces desde el aparato de Golgi hacia el retículo endoplásmico mediante un motivo de retención KDEL, y posteriormente se transloca al citosol donde inhibe la síntesis proteica e induce apoptosis (Kreitman RJ. et. al., BioDrugs 2009; 23:1-13).

Los anticuerpos anti-HER2 utilizados en este ejemplo son **025**, **153** y **169**. Además, se utilizó un anticuerpo monoclonal completamente humano IgG1, κ **005** con la siguiente secuencia: **005**:

SEQ ID NO: 164	VH 005	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISKASGYSFHFYWGIVRQMPGKGLEWM GSIYPGDS DTRYRPSFQGQV TISADKSISTAYLQW TSLKASDTAIYYCAR QRGDYYYYFYGMDWVGQGT TVTVSS
SEQ ID NO: 165	VL 005	EIVLTQSPGTL SLS PGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQVPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSSLTFGG GTKVEIK
SEQ ID NO: 166	VH CDR1	GYSFHFYW
SEQ ID NO: 167	VH CDR2	YPGDSDT
SEQ ID NO: 168	VH CDR3	ARQRGDYYYYFYGMDV
SEQ ID NO: 169	VL CDR1	QSVSSSY
	VL CDR2	GAS
SEQ ID NO: 170	VL CDR3	QQYGSSLT

Se utilizaron los siguientes anticuerpos como materiales de partida:

IgG1-005-ITL = **005** IgG1, κ que tiene Ile en la posición 350, Thr en la posición 370 y Leu en la posición 405
 IgG1-005-K409R = **005** IgG1, κ que tiene una Arg en la posición 409
 IgG1-025-ITL = **025** IgG1, κ que tiene Ile en la posición 350, Thr en la posición 370 y Leu en la posición 405
 IgG1-153-ITL = **153** IgG1, κ que contiene Ile en la posición 350, Thr en la posición 370 y Leu en la posición 405
 IgG1-153-K409R = **153** IgG1, κ que tiene una Arg en la posición 409

IgG1-169-K409R = **169** IgG1, κ que tiene una Arg en la posición 409

Se generaron los siguientes anticuerpos biespecíficos en analogía con el procedimiento posterior:

- 5 IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R
- IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R
- IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R
- IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R
- IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R
- 10 IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R

Los anticuerpos biespecíficos se produjeron de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 20. Las mezclas de anticuerpos, que contenían cada anticuerpo con una concentración final de 0,5 mg/ml, se incubaron con 25 mM de 2-mercaptoetilamina-HCl (2-MEA) en un volumen total de 100 μ l TE a 37 °C durante 90 min. Para parar la reacción de reducción, el agente reductor 2-MEA se retiró desalando las muestras utilizando columnas de centrifugación (Microcon centrifugal filters, 30k, Millipore) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 se preincubaron con el anti-kappa-ETA' antes de la incubación con las células A431. Las células A431 expresan ~ 15.000 anticuerpos HER2 por célula (determinado mediante el análisis Qifi) y no son sensibles al tratamiento con anticuerpo HER2 'desnudos'.

Primero, se determinó la concentración óptima de anti-kappa-ETA' para cada línea celular, es decir, la dosis máxima tolerada que no da lugar a la inducción de muerte celular no específica. Se sembraron células A431 (2500 células/pocillo) en un medio de cultivo celular normal en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos (Greiner bio-one) y se les permitió que se adhirieran durante al menos 4 horas. A continuación, se incubaron las células con una serie de diluciones de 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 y 0 μ g/ml de anti-kappa-ETA' en un medio de cultivo celular normal. Después de 3 días, se cuantificó la cantidad de células viables con azul alamar (BioSource International, San Francisco, US) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se controló la fluorescencia utilizando el lector EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlandia) con los ajustes de azul alamar convencionales. La mayor concentración de anti-kappa-ETA' que no destruía las células por sí misma (1 μ g/ml para las células A431) se utilizó para los siguientes experimentos.

A continuación, se ensayó el efecto de los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 y anticuerpos monoespecíficos HER2 preincubados con anti-kappa-ETA' en cuando a su capacidad para inducir la destrucción celular. Las células se sembraron como se describió anteriormente. Se hicieron diluciones en serie de los anticuerpos específicos de HER2 (anticuerpos monoespecíficos y biespecíficos) y se preincubaron durante 30 min con la concentración predeterminada de anti-kappa-ETA' antes de añadirlos a las células. Después de 3 días de incubación a 37 °C, la cantidad de células viables se cuantificó como se ha descrito anteriormente. La señal de azul alamar de las células tratadas con anticuerpos conjugados con anti-kappa-ETA' se representó en comparación con las células tratadas sin el tratamiento con el anticuerpo. Los valores de la CE₅₀ y la muerte celular máxima se calcularon utilizando el software GraphPad Prism 5. Se utilizó Estaurosporina (23,4 μ g/ml) como control positivo para la destrucción celular. Se utilizó un isotipo de anticuerpo de control (IgG1/kappa; IgG1-3G8-QITL) como control negativo.

La Figura 9 y la Tabla 9, muestran todos los anticuerpos HER2 biespecíficos preincubados con anti-kappa-ETA' eran capaces de destruir las células A431 de una manera dependiente de la dosis. Estos resultados demuestran que la mayoría de los anticuerpos biespecíficos HER2 ensayados eran más eficaces que el anticuerpo monoespecífico presente en la combinación en este ensayo anti-kappa-ETA'. Además, la eficacia de los anticuerpos biespecíficos 005X169, 025X169 y 153X169 demostraba que la eficacia de un anticuerpo monoespecífico que carece de actividad en este ensayo *in vitro* de destrucción por ETA' dirigido por kappa, el anticuerpo específico de HER2 (**169**), puede aumentarse mediante la combinación biespecífica con otro anticuerpo específico de HER2.

Tabla 9: Valores de la CE₅₀ y porcentaje máximo de destrucción celular de células AU565 tratadas con los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 conjugados con anti-kappa-ETA'. "Ndet" significa no detectado.

anticuerpo	Porcentaje destruidas	CE50 [ng/ml]
Herceptin	2,79	Ndet
IgG1-005-ITL	79,34	2,57
IgG1-005-K409R	79,83	2,87
IgG1-025-ITL	69,81	3,76
IgG1-153-ITL	70,66	12,45
IgG1-153-K409R	72,84	15,47

(continuación)

anticuerpo	Porcentaje destruidas	CE50 [ng/ml]
IgG1-169-K409R	16,45	3,45
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R	59,94	4,28
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R	63,45	4,27
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R	80,82	7,66
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R	45,88	7,97
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R	80,05	4,51
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R	84,68	29,14

Ejemplo 22 - Regulación negativa del receptor de HER2 mediante incubación con anticuerpos biespecíficos que se dirigen contra diferentes epítomos de HER2

5 Los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 se pueden unir con dos epítomos diferentes o dos receptores de HER2 espacialmente diferentes. Esto puede permitir que otros anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 se unan a los epítomos restantes de estos receptores. Esto podría dar como resultado un entrecruzamiento de receptores multivalente (en comparación con la dimerización inducida por los anticuerpos monovalentes) y en consecuencia un aumento de la regulación negativa del receptor. Para investigar si los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 inducen un aumento de la regulación negativa de HER2, se incubaron células AU565 con anticuerpos y anticuerpos biespecíficos durante tres días. Se determinaron los niveles totales de HER2 y los niveles de HER2 unido al anticuerpo.

15 Las células AU565 se sembraron en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos (100.000 células /pocillo) en un medio de cultivo celular normal y se cultivaron durante tres días a 37 °C en presencia de 10 µg/ml de anticuerpos HER2 con ITL o la mutación K409R o los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2. Como control, también se ensayó la combinación (1:1) de dos anticuerpos HER2 monoespecíficos, con estructuras de IgG1 sin modificar, a una concentración final de 10 µg/ml. Después del lavado con PBS se lisaron las células incubándolas durante 30 min a temperatura ambiente con 25 µl del tampón de lisis Surefire (Perkin Elmer, Turku, Finlandia). Se cuantificaron los niveles de proteína total utilizando el reactivo del ensayo proteico de ácido bicichonínico (BCA) (Pierce) siguiendo el protocolo del fabricante. Los niveles proteicos de HER2 en los lisados se analizaron utilizando un ELISA sándwich específico de HER2. Se utilizó un anticuerpo de conejo anti-dominio intracelular de HER2 humano (Cell Signaling) para capturar el HER2 y se utilizó un anticuerpo policlonal biotinilado de cabra anti-HER2 humano (R&D systems, Minneapolis, USA), seguido por estreptavidina-poli-HRP, para detectar el HER2 unido. La reacción se visualizó utilizando ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (una pastilla de ABTS diluida en 50 ml de tampón ABTS [Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos]) y se paró con ácido oxálico (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). Se midió la fluorescencia 405 nm en un lector de placas de microtitulación (Biotek Instruments, Winooski, USA) y la cantidad de HER2 se expresó como un porcentaje con respecto a las células sin tratar.

30 Los resultados se muestran en la Figura 10 y la Tabla 10 que demuestra que todos los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 inducían ≥ 40 % de modulación negativa de HER2. De manera interesante, todos los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 presentaban un aumento de la modulación negativa de HER2 en comparación con ambos equivalentes monoespecíficos.

35 **Tabla 10:** El HER2 x HER2 biespecífico inducía la modulación negativa de HER2 representado como el porcentaje de HER2 en comparación con las células sin tratar

anticuerpo	% HER2 en comparación con células sin tratar
Herceptin	71
IgG1-005-ITL	54
IgG1-005-K409R	50
IgG1-025-ITL	64
IgG1-153-ITL	43
IgG1-153-K409R	40
IgG1-169-K409R	64
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R	29

(continuación)

anticuerpo	% HER2 en comparación con células sin tratar
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R	38
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R	29
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R	34
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R	23
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R	28
IgG1-005 + IgG1-169	28
IgG1-025 + IgG1-005	28
IgG1-025 + IgG1-153	23
IgG1-025 + IgG1-169	25
IgG1-153 + IgG1-005	23
IgG1-153 + IgG1-169	23
Isotipo de control	108

Ejemplo 23 - Colocalización de anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 con el marcador lisosómico LAMP1 analizado por microscopía confocal

5

El ensayo de modulación negativa de HER2 como se describe en el Ejemplo 22 indicaba que los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 eran capaces de aumentar la degradación lisosómica de HER2. Para confirmar estos hallazgos, se aplicó una tecnología de microscopía confocal. Se cultivaron las células AU565 en cubreobjetos de cristal (con un grosor de 1,5 micrómetros, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Alemania) en un medio de cultivo tisular convencional a 37 °C durante 3 días. Las celas preincubadas durante 1 hora con 50 µg/ml de leupeptin (Sigma) para bloquear la actividad lisosómica después de lo cual se añadieron 10 µg/ml de anticuerpos HER2 mono-específicos o anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2. También se ensayó la combinación (1:1) de dos anticuerpos IgG1 mono-específicos a una concentración final de 10 µg/ml. Las células se incubaron durante 3 o 18 horas adicionales a 37 °C. A continuación, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con un 4 % de formaldehído (Klinipath). Los cubreobjetos se lavaron con tampón de bloqueo (PBS suplementado con 0,1 % de saponina [Roche]) y un 2 % de BSA [Roche] y se incubaron durante 20 min con el tampón de bloqueo que contenía 20 mM de NH₄Cl para inactivar el formaldehído. Los cubreobjetos se lavaron de nuevo con tampón de bloqueo y se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente con un anticuerpo de ratón anti-CD107a humano (LAMP1) (BD Pharmigen) para teñir/identificar los lisosomas. A continuación del lavado con el tampón de bloqueo, los cubreobjetos se incubaron 30 min a temperatura ambiente con un coctel de anticuerpos secundarios; de cabra anti-IgG-Cy5 de ratón (Jackson) y de cabra anti-IgG-FITC humana (Jackson). Los cubreobjetos se lavaron de nuevo con tampón de bloqueo y se montaron durante una noche sobre los portaobjetos de microscopio utilizando 20 µl de medio de montaje (se disolvieron 6 gramos de Glicerol [Sigma] y 2,4 gramos de Mowiol 4-88 [Omnilabo] en 6 ml de agua destilada a la que se habían añadido 12 ml de Tris 0,2 M [Sigma] pH 8,5 seguido por la incubación durante 10 min a 50-60 °C. Se hicieron alícuotas del medio de montaje y se almacenaron a -20 °C). Se crearon imágenes de los portaobjetos con un microscopio confocal Leica SPE-II (Leica Microsystems) equipado con una lente de objetivo de inmersión en aceite de 63x 1,32-0,6 y un software LAS-AF. Para permitir la cuantificación de las intensidades de píxel que se solapan se debería evitar la saturación de píxeles. Por lo tanto, se disminuyó la intensidad del láser FITC al 10 %, la ganancia inteligente se fijó en 830 V y la salida inteligente se fijó en -9,48 %. Utilizando estos ajustes, los anticuerpos biespecíficos se visualizaron claramente sin saturación de píxeles, pero los anticuerpos mono-específicos a veces eran difíciles de detectar. Para comparar la colocalización lisosómica entre los anticuerpos mono-específicos y biespecíficos, estos ajustes se mantuvieron en todos los portaobjetos confocales analizados.

35

Se analizaron las imágenes TIFF con escala de grises de 12-bit para la colocalización utilizando el software MetaMorph® (versión Meta Series 6.1, Molecular Devices Inc, Sunnyvale California, USA). Las imágenes de FITC y Cy5 se importaron apiladas y se restó el ruido de fondo. Se utilizaron ajustes de umbrales idénticos (fijación manual) para todas las imágenes de FITC y todas las imágenes de Cy5. La colocalización se representó como la intensidad en píxeles de FITC en la región de solapamiento (ROI), donde la ROI estaba compuesta de todas las regiones positivas de Cy5. Para comparar los diferentes portaobjetos teñidos con varios anticuerpos HER2, anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 o la combinación de dos anticuerpos mono-específicos diferentes, las imágenes se normalizaron utilizando la intensidad de píxeles de Cy5. Se utilizó un anticuerpo de cabra anti-IgG-Cy5 de ratón para teñir el marcador lisosómico LAMP1 (CD107a). La intensidad de píxeles de LAMP1 no debería diferenciarse entre los distintos anticuerpos HER2 o los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 ensayados (una célula tiene una

40

intensidad de pixel de Cy5 de aproximadamente 200.000).

$$\text{Valores normalizados para la colocalización de FITC y Cy5} = \left[\frac{\text{TPI-FITC} \times \text{porcentaje de colocalización de FITC-Cy5}}{100} \right] \times \left[\frac{200.000}{\text{TPI-Cy5}} \right]$$

5

En esta fórmula, se establece TPI como la Intensidad de Píxeles Total.

La Figura 11 y la Tabla 11 presentan el porcentaje de células viables, según se mide por el solapamiento de la intensidad de los píxeles de FITC con Cy5 en distintos anticuerpos HER2 monoespecíficos y anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2. Para cada anticuerpo o molécula biespecíficos representados, se analizaron tres imágenes diferentes de un portaobjetos que contenía ~1, 3 o >5 células. Se observaba una variación significativa entre las diferentes imágenes de cada portaobjetos. Sin Embargo, era evidente que todos los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 mostraban un aumento de la colocalización con el marcador lisosómico LAMP1, cuando se comparaban con sus equivalentes monoespecíficos. Estos resultados indican que una vez que se internalizan, los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 se clasifican eficazmente hacia los compartimentos lisosómicos, haciéndolos adecuados para una estrategia de conjugación de un fármaco con anticuerpos biespecíficos.

15

Tabla 11: Media de las intensidades de píxel FITC que se solapan con Cy5 representada como unidades arbitrarias

anticuerpo	Intensidad de píxel de FITC en lisosomas [unidades arbitrarias]
Herceptin	0,218
IgG1-005-ITL	0,070
IgG1-025-ITL	0,268
IgG1-153-ITL	0,102
IgG1-169-K409R	0,220
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R	0,531
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R	0,347
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R	0,582
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R	0,439
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R	0,494
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R	0,604
IgG1-025 + IgG1-169	0,576
IgG1-153 + IgG1-005	0,636
IgG1-153 + IgG1-169	0,626

20 **Ejemplo 24 - Inhibición de la proliferación de células AU565 al incubarlas con anticuerpos HER2 monoespecíficos y biespecíficos HER2 x HER2**

Los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 se ensayaron en cuanto a 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 determinó con el kit Qifi), el HER2 es constitutivamente activo en estas células y por lo tanto no depende de la heterodimerización inducida por el ligando. En una placa de cultivo tisular de 96 pocillos (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania), se sembraron 9,000 células AU565 por pocillo en presencia de 10 µg/ml de anticuerpo HER2 o anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 en medio de cultivo celular libre de suero. Como control, se sembraron las células en medio libre de suero sin anticuerpo o anticuerpos biespecíficos. Después de tres días, se cuantificó la cantidad de células viables como azul alamar (BioSource International, San Francisco, US) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se controló la fluorescencia utilizando el lector EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlandia) con los ajustes de azul alamar convencionales. La señal de azul alamar de las células tratadas con anticuerpo se representó como un porcentaje relativo de células sin tratar.

35 La Figura 12 y la Tabla 12 representan la intensidad de fluorescencia de azul alamar de las células AU565 después de la incubación con anticuerpos HER2 y anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2. Se incluyó el Herceptin® (trastuzumab) como control positivo y se demostró la inhibición de la proliferación como describen Juntilla TT. et al., Cancer Cell 2009; 15: 429-440. Todos los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2 eran capaces de inhibir la proliferación de células AU565. Los anticuerpos biespecíficos: IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R y IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R eran más eficaces comparados con sus equivalentes anticuerpos monoespecíficos en este ensayo.

40

Tabla 12: Porcentaje de células AU565 viables después del tratamiento con anticuerpos biespecíficos HER2 x HER2.

anticuerpo	Porcentaje de células viables
Herceptin	62
IgG1-005-ITL	91
IgG1-005-K409R	96
IgG1-025-ITL	79
IgG1-153-ITL	98
IgG1-153-K409R	97
IgG1-169-K409R	63
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R	49
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R	61
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R	74
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R	76
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R	71
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R	77
Isotipo de control	95

Ejemplo 25 - Anticuerpos biespecíficos HER2 x CD3 ensayados en un ensayo de citotoxicidad *in vitro*

5 El CD3 es un co-receptor en el complejo de receptor de célula T expresado en células T maduras. La combinación de un brazo Fab de anticuerpo específico de CD3 con un brazo Fab de anticuerpo específico del antígeno tumoral en un anticuerpo biespecífico daría como resultado el direccionamiento específico de las células T a las células tumorales, dando lugar a la lisis de las células tumorales mediada por células T. De la misma manera, las células T
10 positivas a CD3 se podrían dirigir a otras células descarriladas del cuerpo, a células infectadas o directamente a los agentes patógenos.

Se generaron los anticuerpos biespecíficos HER2 x CD3. Las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del brazo Fab específico de HER2 eran como se indicó para el anticuerpo 153 y 169 en el Ejemplo 21. Se
15 utilizaron las siguientes secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera para el brazo Fab específico de CD3:

YTH12.5 (Secuencia como la descrita por Routledge et al., Eur J Immunol. 1991, 21(11):2717-25).

SEQ ID NO: 171	VH YTH12.5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFPMAWVRQAPGKGLEWVSTI STSGGRYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFRQYS GGFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 172	VL YTH12.5	DIQLTQPNVSTSLGSTVKLSCTLSSGNIENNYVHWYQLYEGRSPTTMIYDD DKRPDGVDPDRFSGSIDRSSNSAFLTIHNVAIEDEAIYFCHSYVSSFNVFGGGT KLTVL

20 **huCLB-T3/4** (Secuencia como la descrita por Parren et al., Res Immunol. 1991, 142(9):749-63. Se introdujeron sustituciones menores de aminoácidos para hacer que la secuencia se pareciera más estrechamente a la línea germinal humana).

SEQ ID NO: 173	VH huCLB-T3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQAPGKGLEWVAT ISRYRYIYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRPLY GSSPDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 174	VL huCLB-T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWYQQKPGQAPRLLIYDTSK LASGIPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCFQSGSYPLTFGSGTKLEM

Todos los anticuerpos se expresaron como IgG1, κ modificándose en las regiones Fc de la siguiente manera: IgG1-HER2-153-K409R y IgG1-HER2-153-N297Q-K409R, IgG1-HER2-169-K409R, IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L y IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L, IgG1-YTH12.5-F405L y IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L.

5 Los anticuerpos biespecíficos de estos anticuerpos específicos de HER2 y CD3 se generaron como se describe en el Ejemplo 20 y se ensayaron en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* utilizando células AU565. Las células AU565 se cultivaron hasta casi la confluencia. Las células se lavaron dos veces con PBS y se tripsinizaron durante 5 minutos a 37 °C. Se añadieron 12 ml de medio de cultivo para inactivar la tripsina y se centrifugaron las células durante 5 min, 800 rpm. Las células se resuspendieron en 10 ml de medio de cultivo y se hizo una suspensión de células únicas pasando las células a través de un filtro celular. Se añadieron 100 μ l de una suspensión de 5×10^5 células/ml a cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos, y se incubaron las células al menos 3 h a 37 °C, un 5 % de CO₂ para permitir la adherencia a la placa. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de la sangre de voluntarios sanos utilizando tubos de 30 ml Leucosep de acuerdo con el protocolo del fabricante (Greiner Bio-one). Se aislaron las células T de las preparaciones de PBMC mediante selección negativa utilizando un kit Untouched Human T-cells Dynabead (Dyna) (Dyna). Las células aisladas se resuspendieron en un medio de cultivo hasta una concentración final de 7×10^6 células/ml.

El medio de cultivo se retiró de las células AU565 adheridas, y se sustituyó con 50 μ l/pocillo de dilución de anticuerpos concentrada 2x y 50 μ l/pocillo de 7×10^6 células T/ml (relación efectora:diana = 7:1). Las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C, un 5 % de CO₂. Los sobrenadantes se retiraron y se lavaron las placas dos veces con PBS. Se añadieron a cada pocillo 150 μ l de medio de cultivo y 15 μ l de azul alamar. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37 °C, un 5 % de CO₂, y se midió la absorbancia (Envision, Perkin Elmer).

La Figura 13 y la Tabla 13 muestran que mientras que los anticuerpos de control (Herceptin® IgG1 mono específica de Her2, YTH12.5 IgG1 mono específica de CD3 y huCLB-T3/4 IgG1 mono específica, b12 IgG1 mono específica de un antígeno irrelevante y anticuerpos biespecíficos CD3 x b12) no inducían citotoxicidad mediada por células T, los anticuerpos biespecíficos huCLB/Her2-153, huCLB/Her2-169, YTH12.5/Her2-153 e YTH12.5/HuCLB/Her2-169 (Dúo) Her2 x CD3 inducían citotoxicidad mediada por células T de las células AU565. Los anticuerpos biespecíficos que contenían Her2-169 eran más potentes que los que contenían Her2-153. Se produjeron mutantes de IgG1-hu-CLB-T3/4, IgG1-YTH12.5 y Her2-153 que contenían la mutación N297Q para eliminar un sitio de glicosilación; la glicosilación en este sitio es crítica para las interacciones con el receptor IgG-Fc gamma (Bolt S et al., Eur J Immunol 1993, 23:403-411). La Figura 13 muestra que la mutación N297Q y por lo tanto la ausencia de glicosilación Fc de los anticuerpos biespecíficos Her2 x CD3 YTH12.5/Her2-153 y huCLB/Her2-153 no tienen impacto en el potencial para inducir citotoxicidad mediada por células T dependiente de la dosis de las células AU565.

Tabla 13: Valores de la CE₅₀ de destrucción celular inducida por anticuerpos biespecíficos HER2 x CD3. "Ndet" significa no detectado.

anticuerpo	CE50 [ng/ml]
Herceptin	Ndet
Dúo huCLB-Q/153-Q	10,55
Dúo huCLB-Q/B12-Q	Ndet
huCLB-Q	Ndet
B12-Q	Ndet
Dúo YTH12.5-Q/153-Q	10,73
Dúo YTH12.5-Q/B12-Q	Ndet
YTH12.5-Q	Ndet
B12-Q	Ndet

Ejemplo 26 - Modulación negativa de HER2

40 Para investigar si el aumento de internalización de HER2 inducida por los anticuerpos 098 y 153 del grupo 3 también daba como resultado el aumento de la modulación negativa del receptor, se incubaron las células AU565 con anticuerpos HER2 durante 3 días, y se analizó la presencia de HER2. Las células AU565 se sembraron en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos (100.000 células /pocillo) en un medio de cultivo celular normal y se cultivaron durante 3 días a 37 °C en presencia de 10 μ g/ml del anticuerpo HER2. Después del lavado con PBS se lisaron las células incubándolas durante 30 min a temperatura ambiente con 25 μ l del tampón de lisis Surefire (Perkin Elmer, Turku, Finlandia). Se cuantificaron los niveles de proteína total utilizando el reactivo del ensayo proteico de ácido bicichonínico (BCA) (Pierce) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles proteicos de HER2 en los lisados se analizaron utilizando un ELISA sándwich específico de HER2. Se utilizó un anticuerpo de conejo anti-

dominio intracelular de HER2 humano (Cell Signaling) para capturar el HER2 y se utilizó un anticuerpo policlonal biotinilado de cabra anti-HER2 humano (R&D), seguido por estreptavidina-poli-HRP, para detectar el HER2 unido. La reacción se visualizó utilizando ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS: se diluye una pastilla de ABTS en 50 ml de tampón ABTS [Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos]) y se paró con ácido oxálico (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). Se midió la fluorescencia 405 nm en un lector de placas de microtitulación (Biotek Instruments, Winooski, USA) y la cantidad de HER2 se expresó como un porcentaje con respecto a las células sin tratar.

Los resultados que se muestran en la Figura 14 y la Tabla 14 demuestran que ambos anticuerpos del Grupo 3 (098 y 153) inducían más del 50 % de modulación negativa del HER2. Por el contrario, los anticuerpos 025, 169 y Herceptin apenas inducían modulación negativa (aproximadamente un 20 % de las células sin tratar). Esto estaba en línea con el aumento de internalización observado por los anticuerpos 098 y 153.

Tabla 14: Modulación negativa de HER2 inducida por anticuerpos representada como un porcentaje de HER2 en comparación con las células sin tratar

anticuerpo	% HER2 en comparación con las células sin tratar
Herceptin	80
IgG1-1014-169	82
IgG1-1014-025	85
IgG1-1014-098	44
IgG1-1014-153	50
Isotipo de control	108

Ejemplo 27 - Colocalización de anticuerpos HER2 con el marcador lisosómico LAMP1 analizado por microscopía confocal

El ensayo de modulación negativa como se ha descrito en el Ejemplo 26 y el ensayo de internalización basado en CypHer-5E como se ha descrito en el Ejemplo 19 indicaban que los anticuerpos HER2 del grupo 3 se internalizaban más eficazmente y se dirigían hacia los lisosomas en comparación con los anticuerpos de los Grupos 1 y 2. Sin embargo en estos experimentos la creación de imágenes confocales se hizo con ajustes que permitían la discriminación entre anticuerpos mono-específicos y bio-específicos pero no entre los diferentes anticuerpos mono-específicos, de hecho, con estos ajustes los anticuerpos mono-específicos apenas se podían detectar. Para ser capaces de comparar entre los diferentes anticuerpos mono-específicos, se midieron de nuevo los portaobjetos confocales con ajustes de aumento de ganancia, para aumentar la intensidad de fluorescencia. Todas las demás etapas del procedimiento eran las mismas que se describen en el Ejemplo 23.

Los resultados se representan en la Figura 15 y la Tabla 15, y muestran la intensidad de los píxeles de FITC que se solapa con Cy5 en distintos anticuerpos HER2 mono-específicos. Para cada portaobjetos se analizaron tres imágenes diferentes que contenían ~ 1, 3, o >5 células. Se observaba una variación significativa entre las diferentes imágenes de cada portaobjetos. Además, era evidente que los anticuerpos 098 y 153 se dirigían más eficazmente hacia los compartimentos lisosómicos, en comparación con el 025, pertuzumab, 169 y Herceptin. Esto se correlacionaba bien con el aumento de internalización y degradación del receptor inducida por estos anticuerpos.

Tabla 15: Media de las intensidades de píxel FITC que se solapan con Cy5 representada como unidades arbitrarias

anticuerpo	Intensidad de píxel de FITC en lisosomas [unidades arbitrarias]
TH1014-098	0,522
TH1014-153	0,409
TH1014-025	0,248
TH1014-pert	0,214
TH1014-169	0,255
Herceptin	0,236

Ejemplo 28 - Intercambio del dominio extracelular de HER2 de humano a pollo

Para definir adicionalmente las regiones de unión de HER2 reconocidas por los anticuerpos de los cuatro grupos diferentes de competición cruzada, se llevó a cabo un experimento de intercambio del dominio extracelular de HER2. En este punto, se generó una pequeña biblioteca de síntesis genética con cinco construcciones, intercambiando las

secuencias del dominio I, II, III o IV del dominio extracelular del HER2 humano por la correspondiente secuencia de HER2 de pollo (Gallus gallus Isoforma B, NCBI: NP_001038126,1): 1) el HER2 completamente humano (Uniprot P04626) de aquí en adelante denominado hu-HER2, 2) hu-HER2 con el dominio de pollo I (reemplazando los aminoácidos (aa) 1-203 del Her2 humano con la región correspondiente del Her2 de pollo) de aquí en adelante denominado hu-HER2-ch(I), 3) el hu-HER2 con el dominio de pollo II (reemplazando los aminoácidos (aa) 204-330 del Her2 humano con la región correspondiente del Her2 de pollo) de aquí en adelante denominado hu-HER2-ch(II), 4) el hu-HER2 con el dominio de pollo III (reemplazando los aa 331-507 del Her2 humano con la región correspondiente del Her2 de pollo) de aquí en adelante denominado hu-HER2-ch(III) y 5) el hu-HER2 con el dominio de pollo IV (reemplazando los aa 508-651 del Her2 humano con la región correspondiente del Her2 de pollo) de aquí en adelante denominado hu-HER2-ch(IV). Los ortólogos de HER2 humano y de pollo mostraban un 67 % de homología en su dominio extracelular con un 62 % de homología en el dominio I, un 72 % de homología en el dominio II, un 63 % de homología en el dominio III y un 68 % de homología en el dominio IV. Las construcciones se transfectaron transitoriamente en la línea celular Freestyle™ de CHO-S (Invitrogen) utilizando el reactivo de transfección Freestyle MAX (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se cultivaron las células transfectadas durante 20 horas. La unión del anticuerpo HER2 a las células transfectadas se analizó mediante citometría de flujo: Las células CHO-S transfectadas se recolectaron, se lavaron con tampón FACS y se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpo HER2 (30 minutos sobre hielo). La unión de los anticuerpos HER2 se detectó utilizando un anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson). Para comprobar si la expresión entre los diferentes lotes era la misma, se fijaron las células y se permeabilizaron utilizando la solución Cytotfix/Cytoperm (BD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se tiñeron con un anticuerpo de conejo anti-HER2 humano intracelular (DAKO) en combinación con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con PE (Jackson). Se utilizó un isotipo de anticuerpo de control como control negativo. Se midió la fluorescencia en un FACS Canto-II (BD) y se hicieron las curvas de unión mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism V4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). La pérdida de unión se utilizó como resultado de lectura para identificar que dominios HER2 eran reconocidos por los diferentes anticuerpos.

Las curvas de unión ejemplares para el anticuerpo 153 se muestran en la Figura 16. Todos los resultados de unión se muestran en la Tabla 16, Grupo 1 de anticuerpos HER2 050, 084, 169 y Herceptin presentaban la pérdida de unión de Hu-HER-ch(IV), pero no a las proteínas con uno de los dominios restantes intercambiados, demostrando que los epítomos de los mAb del Grupo 1 residen en el dominio IV del HER2, los anticuerpos del Grupo 2 025, 091, 129 y pertuzumab mostraba solamente la pérdida de unión de Hu-HER2-ch(II) indicando que el epítomo reside en el dominio II de HER2. Los anticuerpos 098 y 153 ambos definidos en el Grupo 3 en el ensayo de competición cruzada, pero mostraba algunas variaciones en el experimento de intercambio. El anticuerpo 098 mostraba claramente una pérdida de unión al Hu-HER2-ch(I) y una disminución menor en la unión al Hu-HER2-ch (II), mientras que el 153 presentaba solamente una pérdida de unión al Hu-HER2-ch (II). Estos datos sugieren que los mAb del Grupo 3 098 y 153 también se pueden unir, al menos parcialmente, al dominio II del HER2, con epítomos que posiblemente se extienden hasta el dominio I, como es el caso del 098.

Tabla 16: Sumario de la unión del anticuerpo HER2 a diferentes construcciones de receptor 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 la unión normal, ++ indica una CE₅₀ reducida pero la unión máxima similar en comparación con la unión observada para hu-HER2, + indica una CE₅₀ reducida y una reducción de la unión máxima detectada en comparación con la unión observada para hu-HER2, - indica que no hubo unión.

Anticuerpo	Grupo	Dominio HER2 mezclado				
		FL	I	II	III	IV
Herceptin	1	+++	+++	+++	+++	-
050	1	+++	+++	+++	+++	-
084	1	+++	+++	+++	+++	-
169	1	+++	+++	+++	+++	+
Pertuzumab	2	+++	+++	+	+++	+++
025	2	+++	+++	-	+++	+++
091	2	+++	+++	-	+++	+++
129	2	+++	+++	-	+++	+++
153	3	+++	+++	-	+++	+++
098	3	+++	-	++	+++	+++

Ejemplo 29 - Eficacia *in vivo* de los HuMab HER2 091, 084, y 169 en xenoinjertos de carcinoma gástrico humano NCI-N87 en ratones SCID

5 Se determinó el efecto *in vivo* de los HuMab HER2 091 (Grupo 2 de competición cruzada) 084 y 169 (ambos del grupo 1 de competición cruzada) en el crecimiento tumoral y supervivencia en un modelo de xenoinjerto de carcinoma gástrico humano NCI-N87 en ratones hembra CB.17 con inmunodeficiencia grave combinada (SCID). Se inyectaron por vía s.c. 10×10^6 células tumorales NCI-N87 en un 50 % de matrigel en ratones hembra SCID, 10 ratones por grupo. Ocho días después de la inoculación, se inició el tratamiento intravenoso con los HuMab HER2 10 091, 084 y 169 o el anticuerpo de control HuMab-HepC. En la Figura 17 (A) esto se indica como día 1, día de inicio del tratamiento. La primera dosis era de 40 mg/kg, seguido por 10 mg/kg los días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25 después del inicio del tratamiento.

El volumen tumoral se determinó al menos 2 veces por semana. Los volúmenes (mm^3) se calcularon a partir de mediciones con un calibre (PLEXX) como la $(\text{anchura}^2 \times \text{longitud})/2$.

15 Los resultados se representan en la Figura 17A y 17B que muestra que los ratones a los que se administró el HuMab 084, 169 y 091 presentaban un crecimiento tumoral más lento (A) y mejor supervivencia (B) que los ratones que recibieron el anticuerpo de control negativo HuMab-HepC. Todos los tratamientos se toleraron bien.

Ejemplo 30 - Tratamiento terapéutico de xenoinjertos de tumor de mama BT-474 en ratones atímicos Balb/C

20 Se determinó el efecto del tratamiento terapéutico de cinco HuMab HER2 diferentes sobre los xenoinjertos de tumor de mama humano BT-474 en ratones atímicos Balb/C. Se inyectaron células tumorales BT-474 24 a 72 horas después de una radiación de cuerpo completo con una fuente de γ (1,8 Gy, Co60, BioMep, Francia). Se inyectaron por vía subcutánea 2×10^7 células BT-474 en 200 μl de RPMI 1640 que contenía matrigel (50:50, v:v; BD Biosciences) en el flanco derecho de los ratones atímicos hembra Balb/C. El peso corporal y el volumen tumoral de 25 los ratones se registraron dos veces a la semana. Se calcularon los volúmenes tumorales (mm^3) a partir de mediciones con un calibre (PLEXX) como: $(\text{anchura}^2 \times \text{longitud}) / 2$.

El tratamiento con los HuMab HER2 se inició cuando los tumores alcanzaban un volumen medio de 100-200 mm^3 . Los ratones que tenían el tumor se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 8 ratones. Un grupo recibió inyecciones intravenosas (i.v.) semanales del mAb Hu-Mab-HepC de control. Los otros cuatro grupos recibieron 30 inyecciones i.v. semanales de HuMab HER2 025, 129, 153 y 091 con una primera dosis de 20 mg/kg y 9 dosis siguientes de 5 mg/kg.

Los resultados se representan en la Figura 18A y 18B y muestran que el crecimiento del tumor BT-474 se inhibía parcialmente con el tratamiento con HuMab 129 y HuMab 153 (aproximadamente un 30 y un 50 % de inhibición en comparación con el tratamiento con el HuMab-HepC de control). El HuMab-025 y HuMab-091 inhibían fuertemente 35 el crecimiento del tumor BT-474 y el tiempo para alcanzar un volumen tumoral de 800 mm^3 estaba significativamente retrasado por estos anticuerpos. La supervivencia también mejoraba en los ratones que recibieron HuMab HER2.

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Genmab A/S

<120> Anticuerpos monoclonales contra HER2

<130> P/62.WO

45

<160> 174

<170> PatentIn versión 3.5

50

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> *homo sapiens*

55

<400> 1

ES 2 733 921 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn 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 Leu Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr 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 Asp Arg Ile Val Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<400> 2

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
 1 5

10
 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> *homo sapiens*

<400> 3

Leu Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr
 1 5

20
 <210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 4

Ala Arg Asp Arg Ile Val Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

30 <210> 5

ES 2 733 921 T3

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

5 <400> 5

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 Arg
 85 90 95

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

10 <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15 <400> 6

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5

20 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 7

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
 1 5

25 <210> 8
 <211> 119
 <212> PRT
 30 <213> *homo sapiens*

<400> 8

ES 2 733 921 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 Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

10
 <210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> *homo sapiens*

<400> 10

Ile Ser Gly Arg Gly Gly Thr Thr
 1 5

20
 <210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

25
 <400> 11

Ala Lys Ala Arg Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

30 <210> 12

ES 2 733 921 T3

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

5 <400> 12

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

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

15 <400> 13

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

20 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 14

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr
 1 5

25 <210> 15
 <211> 121
 <212> PRT
 30 <213> *homo sapiens*

<400> 15

ES 2 733 921 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 Arg Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Asn Thr Val Leu Gly Ile Val Asn His 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 Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Lys Gly Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ile Glu Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<400> 16

Gly Gly Thr Phe Arg Thr Tyr Ala
 1 5

10

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

<400> 17

Ile Asn Thr Val Leu Gly Ile Val
 1 5

20

<210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

25

<400> 18

Ala Arg Glu Lys Gly Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ile Glu Val
 1 5 10

30 <210> 19

ES 2 733 921 T3

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

5 <400> 19

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

10 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15 <400> 20

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

20 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 21

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5

25

30 <210> 22
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 22

ES 2 733 921 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23
<211> 8
5 <212> PRT
<213> *homo sapiens*

<400> 23

Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr Tyr
1 5

10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
15 <213> *homo sapiens*

<400> 24

Ile His His Ser Gly Ser Thr
1 5

20

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
25 <213> *homo sapiens*

<400> 25

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

30 <210> 26

ES 2 733 921 T3

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

5 <400> 26

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 27
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

10

<400> 27

15

Gln Gly Ile Ser Arg Trp
 1 5

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

20

<400> 28

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile Thr
 1 5

25

<210> 29
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

30

<400> 29

ES 2 733 921 T3

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 30
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 30

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 1 5

10

<210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 15 <213> homo sapiens

<400> 31

Ala Arg Leu Tyr Phe Gly Ser Gly Ile Tyr Tyr Leu Asp Tyr
 1 5 10

20

<210> 32
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

25

<400> 32

ES 2 733 921 T3

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

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

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 33
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 <400> 33

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 34
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 <400> 34

Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro Thr
 1 5

<210> 35
 <211> 119
 25 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 <400> 35

ES 2 733 921 T3

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Gly His Lys Phe 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 Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 36
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 <400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe Ala
 1 5

<210> 37
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 <400> 37

Ile Ser Tyr Asp Gly Gly His Lys
 1 5

<210> 38
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 25 <400> 38

Ala Arg Gly Leu Gly Val Trp Gly Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10

ES 2 733 921 T3

<210> 39
 <211> 106
 <212> PRT
 5 <213> *homo sapiens*

<400> 39

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 Trp Thr
 85 90 95

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

10 <210> 40
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15 <400> 40

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5

20 <210> 41
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

25 <400> 41

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Trp Thr
 1 5

30 <210> 42
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

35 <400> 42

ES 2 733 921 T3

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

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

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43
<211> 8
5 <212> PRT
<213> *homo sapiens*

<400> 43

Gly Tyr Ser Phe Ser Ile Tyr Trp
1 5

10
<210> 44
<211> 8
<212> PRT
15 <213> *homo sapiens*

<400> 44

Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Ile
1 5

20
<210> 45
<211> 16
<212> PRT
25 <213> *homo sapiens*

<400> 45

Ala Arg Gln Pro Gly Asp Trp Ser Pro Arg His Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

30 <210> 46

ES 2 733 921 T3

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

5 <400> 46

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Met Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

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

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

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

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

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

<210> 47
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

10

<400> 47

15

```

Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
1           5
    
```

<210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

20

<400> 48

```

Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Leu Thr
1           5
    
```

25

<210> 49
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

30

<400> 49

ES 2 733 921 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 Asn 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
85 90 95

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

Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 50
<211> 8
5 <212> PRT
<213> *homo sapiens*

<400> 50

Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

10
<210> 51
<211> 8
<212> PRT
15 <213> *homo sapiens*

<400> 51

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
1 5

20
<210> 52
<211> 15
<212> PRT
25 <213> *homo sapiens*

<400> 52

Ala Arg Trp Gly Thr Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Phe Asn
1 5 10 15

30 <210> 53
<211> 107

ES 2 733 921 T3

<212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 53

5

```

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
           35           40           45

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

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

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

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

<210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

10

<400> 54

```

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1           5
  
```

15

<210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

20

<400> 55

25

```

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Trp Thr
1           5
  
```

30

<210> 56
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 56

ES 2 733 921 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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Ala Tyr 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 Trp
 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 His Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp
 100 105 110

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

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

<400> 57

10 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
 1 5

<210> 58
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 58

20 Ile Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Thr
 1 5

<210> 59
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

25 <400> 59

Ala Lys Ala His Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp
 1 5 10 15

Tyr

ES 2 733 921 T3

<210> 60
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

5 <400> 60

```

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
          35           40           45

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

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

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

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

10 <210> 61
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15 <400> 61

```

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1           5
  
```

<210> 62
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 62

```

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1           5
  
```

25

<210> 63
 <211> 121
 <212> PRT
 30 <213> *homo sapiens*

<400> 63

ES 2 733 921 T3

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

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

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

Thr Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Ser Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ile Thr Gly Thr Thr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 64
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 64

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Val
 1 5

10 <210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15 <400> 65

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

20 <210> 66
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

25 <400> 66

Ala Arg Gly Gly Ile Thr Gly Thr Thr Gly Val Phe Asp Tyr

1 5 10

ES 2 733 921 T3

<210> 67
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

5 <400> 67

```

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
                35           40           45

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

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

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

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

10 <210> 68
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15 <400> 68

```

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1           5
    
```

20 <210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

25 <400> 69

```

Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Ile Thr
1           5
    
```

30 <210> 70
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 70

ES 2 733 921 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser 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 Asn Ser Asn Tyr Val Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

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

<210> 71
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 71

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 72
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 72

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Ser
 1 5

<210> 73
 <211> 18
 20 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 73

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

Asp Val

ES 2 733 921 T3

<210> 74
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

5 <400> 74

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 Met
 85 90 95

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

10 <210> 75
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15 <400> 75

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5

20 <210> 76
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

25 <400> 76

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Met Tyr Thr
 1 5 10

30 <210> 77
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 77

ES 2 733 921 T3

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

<210> 78
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

5

<400> 78

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

10

ES 2 733 921 T3

<210> 79
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

5 <400> 79

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 80
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15 <400> 80

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

ES 2 733 921 T3

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

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

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

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

<210> 81
 <211> 119
 5 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 81

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 Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10
 <210> 82
 <211> 107
 <212> PRT
 15 <213> *homo sapiens*

<400> 82

ES 2 733 921 T3

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 83
<211> 121
5 <212> PRT
<213> *homo sapiens*

<400> 83

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10
<210> 84
<211> 107
<212> PRT

ES 2 733 921 T3

<213> *homo sapiens*

<400> 84

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 Thr 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 His Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5

<210> 85

<211> 121

<212> PRT

10 <213> *homo sapiens*

<400> 85

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn 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 Leu Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr 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

15

ES 2 733 921 T3

Ala Arg Asp Arg Ile Val Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86

<211> 107

5 <212> PRT

<213> *homo sapiens*

<400> 86

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 Arg
85 90 95

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

10

<210> 87

<211> 121

<212> PRT

15 <213> *homo sapiens*

<400> 87

ES 2 733 921 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn 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 Ile Thr Tyr Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

Gln Asp 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 Asp Arg Ile Ile Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 88
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 88

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 Arg
 85 90 95

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

10
 <210> 89

ES 2 733 921 T3

<211> 120
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

5 <400> 89

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

10

<210> 90
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15

<400> 90

ES 2 733 921 T3

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 91

<211> 120

5 <212> PRT

<213> *homo sapiens*

<400> 91

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

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

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

Gly Glu Ile His His Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Met
 50 55 60

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

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

Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

ES 2 733 921 T3

<210> 92
<211> 107
<212> PRT
<213> *homo sapiens*

5 <400> 92

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

10 <210> 93
<211> 120
<212> PRT
<213> *homo sapiens*

15 <400> 93

ES 2 733 921 T3

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

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

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

Gly Glu Ile His His Val Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 94
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 94

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

10

ES 2 733 921 T3

<210> 95
 <211> 120
 <212> PRT
 5 <213> *homo sapiens*

<400> 95

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 96
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15 <400> 96

ES 2 733 921 T3

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 97
 <211> 120
 5 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 <400> 97

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

ES 2 733 921 T3

<210> 98
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

5 <400> 98

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

10 <210> 99
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15 <400> 99

ES 2 733 921 T3

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

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

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Thr
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 100
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

10 <400> 100

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

ES 2 733 921 T3

<210> 101
 <211> 120
 <212> PRT
 5 <213> *homo sapiens*

<400> 101

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

10 <210> 102
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 15 <400> 102

ES 2 733 921 T3

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 103

<211> 120

5 <212> PRT

<213> *homo sapiens*

<400> 103

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

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

10

ES 2 733 921 T3

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

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

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

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

Arg Leu Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 104
<211> 107
5 <212> PRT
<213> *homo sapiens*

<400> 104

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

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

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

10 <210> 105
<211> 120
<212> PRT
15 <213> *homo sapiens*

<400> 105

ES 2 733 921 T3

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Trp Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 106
- 5 <211> 107
- <212> PRT
- <213> *homo sapiens*
- <400> 106
- 10

ES 2 733 921 T3

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

- <210> 107
- <211> 120
- 5 <212> PRT
- <213> *homo sapiens*
- <400> 107

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

ES 2 733 921 T3

<210> 108
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

5 <400> 108

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

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

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

10

<210> 109
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15

<400> 109

ES 2 733 921 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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Ala Tyr 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 Trp
 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 His Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp
 100 105 110

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

<210> 110
 <211> 107
 <212> PRT
 5 <213> homo sapiens

<400> 110

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

ES 2 733 921 T3

<210> 111
 <211> 124
 <212> PRT
 5 <213> *homo sapiens*

<400> 111

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 Asn Asn Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Thr Gly Tyr 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 His Tyr Phe Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp
 100 105 110

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

10 <210> 112
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15 <400> 112

ES 2 733 921 T3

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 113

<211> 124

5 <212> PRT

<213> *homo sapiens*

<400> 113

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 Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr 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 Gly His Thr Leu Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Leu Phe Asp
 100 105 110

10

ES 2 733 921 T3

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

<210> 114
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 <400> 114

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 115
 <211> 124
 <212> PRT
 15 <213> *homo sapiens*
 <400> 115

ES 2 733 921 T3

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Tyr 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 Gly Tyr Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Ser Phe Asp
100 105 110

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

<210> 116
<211> 107
5 <212> PRT
<213> *homo sapiens*

<400> 116

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

10
<210> 117

ES 2 733 921 T3

<211> 121
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

5 <400> 117

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Thr Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Arg Gly Asp Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 118
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15

<400> 118

ES 2 733 921 T3

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 119

<211> 121

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 119

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 733 921 T3

<210> 120
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

5 <400> 120

```

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

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

    Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
           35           40           45

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

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

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

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

10 <210> 121
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15 <400> 121

ES 2 733 921 T3

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Glu 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 Arg Gly Ser Ile Ile Gly Ser Thr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 122
<211> 107
5 <212> PRT
<213> *homo sapiens*

<400> 122

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

10

ES 2 733 921 T3

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

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

<210> 123
 <211> 121
 5 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 <400> 123

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Tyr Lys 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 Arg Gly Ser Ile Thr Gly Ser Thr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10
 <210> 124
 <211> 107
 <212> PRT
 15 <213> *homo sapiens*
 <400> 124

ES 2 733 921 T3

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

- <210> 125
- <211> 121
- 5 <212> PRT
- <213> *homo sapiens*
- <400> 125

ES 2 733 921 T3

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Arg Gly Ser Ile Thr Gly Ser Thr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 126

<211> 107

5 <212> PRT

<213> *homo sapiens*

<400> 126

ES 2 733 921 T3

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 127

<211> 8

5 <212> PRT

<213> *homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (4)..(4)

<223> Xaa es Arg o Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (7)..(7)

<223> Xaa es Thr o Ser

<400> 127

Ile Ser Gly Xaa Gly Gly Xaa Thr

20

1 5

<210> 128

<211> 8

<212> PRT

25 <213> *homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

30 <222> (5)..(5)

<223> Xaa es Arg o Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

35 <222> (6)..(6)

<223> Xaa es Thr o Ser

<400> 128

Gly Gly Thr Phe Xaa Xaa Tyr Ala
1 5

<210> 129
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> *homo sapiens*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 10 <223> Xaa es Asn o Ile
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 15 <223> Xaa es Thr o Pro
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 20 <223> Xaa es Val o Ile
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 25 <223> Xaa es Val o Ala
 <400> 129

Ile Xaa Xaa Xaa Leu Gly Ile Xaa
1 5

30 <210> 130
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa es Ile o Met
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es Glu o Asp
 45 <400> 130

Ala Arg Glu Lys Gly Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Xaa Xaa
1 5 10

50 <210> 131
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Asn o Ser
 55 <400> 131
 60

ES 2 733 921 T3

Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr Gly
1 5

<210> 132
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> *homo sapiens*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 10 <223> Xaa es Ser, Thr o ll
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 15 <223> Xaa es Ala o Thr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 20 <223> Xaa es Ser o Asn
 <400> 132

Ile Xaa Xaa Tyr Xaa Gly Asn Thr
1 5

25 <210> 133
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Ile o Val
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Ile o Val
 40 <400> 133

Ala Arg Asp Arg Xaa Xaa Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

45 <210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 <220>
 50 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Asp o Gly
 <220>
 55 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa isTyr o Phe
 <400> 134
 60

ES 2 733 921 T3

Gly Gly Ser Phe Ser Xaa Tyr Xaa
1 5

<210> 135
<211> 7
<212> PRT
5 <213> *homo sapiens*

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
10 <223> Xaa es His o Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
15 <223> Xaa es Ser o Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
20 <223> Xaa es Thr o Ala

<400> 135

Ile Xaa His Xaa Gly Ser Xaa
1 5

25 <210> 136
<211> 14
<212> PRT
<213> *homo sapiens*
30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es Tyr, Asn o Leu
35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa es Tyr or Ile
40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa es Asp, Gly o Ala
45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa es Val o Tyr
50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa es Tyr o Leu
55 <400> 136

Ala Arg Gly Xaa Xaa Xaa Ser Gly Xaa Tyr Tyr Phe Asp Xaa
1 5 10

60 <210> 137

ES 2 733 921 T3

<211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Gly o Asp

10 <400> 137

Gly Gly Ser Phe Ser Xaa Tyr Tyr
1 5

15 <210> 138
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es Tyr, Asn o Hi

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

30 <400> 138

Ile Xaa His Ser Gly Xaa Thr
1 5

35 <210> 139
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es Tyr, Phe o Trp

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Tyr o Phe

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es Ile, Thr o Ser

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa es Leu o Phe

<400> 139

Ala Arg Leu Xaa Xaa Gly Ser Gly Xaa Tyr Tyr Xaa Asp Tyr
1 5 10

60

<210> 140

<211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Thr o Phe

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Phe o Tyr

15 <400> 140

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa Ala
1 5

20 <210> 141
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Gly or Ser

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es His o Asn

35 <400> 141

Ile Ser Tyr Asp Gly Xaa Xaa Lys

1 5

40 <210> 142
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es Ala o Tyr

<400> 142

Ala Arg Gly Leu Gly Val Trp Gly Xaa Phe Asp Tyr
1 5 10

50 <210> 143
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)

<223> Xaa es Ser, Asn o Thr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Asn, Asp o Ser
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es Gly o Ala
 <400> 143

15 **Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa Tyr Xaa**
1 5

<210> 144
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> homo sapiens
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 25 <223> Xaa es Ser o Thr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 30 <223> Xaa es Ala o Gly
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 35 <223> Xaa es Tyr o Gly
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 40 <223> Xaa es Ser o Ala
 <400> 144

45 **Ile Ser Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Thr**
1 5

<210> 145
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es Ala o Gly
 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es His o Tyr
 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)

<223> Xaa es Tyr o Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (6)..(6)

<223> Xaa es His, Phe o Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (14)..(14)

<223> Xaa es Leu o Ser

<400> 145

Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Thr Xaa Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

15

<210> 146

<211> 8

<212> PRT

20 <213> *homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

25 <223> Xaa es Ser o Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

30 <223> Xaa es Ile o Ser

<400> 146

Gly Tyr Ser Phe Xaa Xaa Tyr Trp
1 5

35

<210> 147

<211> 8

<212> PRT

<213> *homo sapiens*

40

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Phe o Tyr

45

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es Ile o Thr

50

<400> 147

Ile Xaa Pro Gly Asp Ser Asp Xaa
1 5

55

<210> 148

<211> 16

<212> PRT

<213> *homo sapiens*

<400> 148

Ala Arg Gln Pro Gly Asp Trp Ser Pro Arg His Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

5 <210> 149
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

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

15 <400> 149

Gly Tyr Xaa Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

20 <210> 150
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es Ser o Thr

30 <400> 150

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Xaa
1 5

35 <210> 151
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 151

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

40 **Asp Val**

45 <210> 152
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Asp o Ser

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Tyr or His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es Val o Ala
 5
 <400> 152

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa Xaa
1 5

10 <210> 153
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Asn o Tyr

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es Lys o Glu

25 <400> 153

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Xaa Xaa
1 5

30 <210> 154
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es Gly, Asp o Se

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Ile o Tyr

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Thr o Ile

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Gly o Ser

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es Thr or Ser

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es Thr o Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 5 <223> Xaa es Tyr o Val

 <400> 154

	Ala	Arg	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Phe	Asp	Tyr
	1				5					10				

 10 <210> 155
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es Ile o Leu
 20 <400> 155

	Gln	Gln	Ala	Asn	Ser	Phe	Pro	Xaa	Thr
	1				5				

 25 <210> 156
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Asn o His
 35 <400> 156

	Gln	Gln	Arg	Ser	Xaa	Trp	Pro	Arg	Thr
	1				5				

 40 <210> 157
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Arg o Ser
 50 <400> 157

	Gln	Gly	Ile	Ser	Xaa	Trp
	1				5	

 55 <210> 158
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*
 <400> 158

ES 2 733 921 T3

Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

5 <210> 159
<211> 6
<212> PRT
<213> *homo sapiens*

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es Ser o Asn

<400> 159

Gln Gly Ile Xaa Ser Trp
1 5

15 <210> 160
<211> 9
<212> PRT
20 <213> *homo sapiens*

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa es Tyr o Leu

<400> 160

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Xaa Thr
1 5

30 <210> 161
<211> 6
<212> PRT
<213> *homo sapiens*

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es Ser o Asn

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa es Ser or Asn

45 <400> 161

Gln Gly Ile Xaa Xaa Trp
1 5

50 <210> 162
<211> 9
<212> PRT
<213> *homo sapiens*

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es Lys o Asn

60 <400> 162

Gln Gln Tyr Xaa Ser Tyr Pro Ile Thr
 1 5

5 <210> 163
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

10 <400> 163

Ile Tyr His Ser Gly Asp Thr
 1 5

15 <210> 164
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 164

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

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

<210> 165
 <211> 107
 <212> PRT
 25 <213> *homo sapiens*

<400> 165

ES 2 733 921 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 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

5 <210> 166
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

10 <400> 166

Gly Tyr Ser Phe His Phe Tyr Trp
 1 5

15 <210> 167
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

20 <400> 167

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
 1 5

25 <210> 168
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 168

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

<210> 169
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

<400> 169

ES 2 733 921 T3

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 170
<211> 8
<212> PRT
5 <213> homo sapiens

<400> 170

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr
1 5

10 <210> 171
<211> 119
<212> PRT
<213> homo sapiens
15 <400> 171

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 Ser Phe
20 25 30

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

Ser Thr Ile Ser Thr Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg 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 Phe Arg Gln Tyr Ser Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

20 <210> 172
<211> 110
<212> PRT
<213> homo sapiens
25 <400> 172

ES 2 733 921 T3

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

Thr Val Lys Leu Ser Cys Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ile Glu Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asp Asp Lys Arg Pro Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Val Ala Ile Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys His Ser Tyr Val Ser
85 90 95

Ser Phe Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 173

<211> 119

5 <212> PRT

<213> *homo sapiens*

<400> 173

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Pro Leu Tyr Gly Ser Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10

ES 2 733 921 T3

<210> 174
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

5
 <400> 174

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Val
 20 25 30

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

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

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

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Arg
 100 105

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y que comprende una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 2, 3, y 4, respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 6, DAS, y SEQ ID NO: 7, respectivamente (mAb 169).
2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 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 (mAb 169).
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, que
- (i) tiene un valor de CE_{50} para la unión a las células que expresan HER2 menor de 0,80 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente menor de 0,50 $\mu\text{g/ml}$, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 12;
 - (ii) induce ADCC, preferentemente consiguiendo una liberación de Cr^{51} de al menos un 30 %, más preferentemente de al menos un 40 %, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 15;
 - (iii) promueve una proliferación independiente de ligando de las células AU565 que expresan HER2 menor que F5 cuando se determina como se describe en el Ejemplo 16;
 - (iv) inhibe la proliferación independiente de ligando de las células AU565 que expresan HER2 cuando se determina como se describe en el Ejemplo 16.
4. El anticuerpo de la reivindicación 3, que no promueve la proliferación inducida por ligando de células AU565 que expresan HER2 cuando se determina como se describe en el Ejemplo 17.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que, cuando se conjuga directa o indirectamente con un resto terapéutico tal como una forma truncada de exotoxina A de pseudomonas, es más eficaz que el trastuzumab cuando se conjuga con el mismo resto terapéutico en la destrucción de las células AU565, las células A431, o ambas células AU565 y A431, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 18.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, que comprende un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y un segundo sitio de unión al antígeno que tiene una especificidad de unión diferente, tal como una especificidad de unión para una célula efectora humana, un receptor de Fc humano, un receptor de célula T o un epítipo no solapado de HER2.
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, preferentemente un anticuerpo IgG1, en particular un anticuerpo IgG1, κ .
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo se conjuga con otro resto, tal como un resto citotóxico, un radioisótopo, un fármaco, o una citocina.
9. El anticuerpo de la reivindicación 8, que es conjuga con
- a) un resto citotóxico seleccionado de entre el grupo que consiste en maitansina, caliqueamicina, duocarbamicina, raquelmicina (CC-1065), monometil auristatina E, monometil auristatina F o un análogo, derivado, o profármaco de cualquiera de los mismos;
 - b) una citocina seleccionada de entre el 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
 - c) un radioisótopo, tal como un emisor alfa.
10. Un conjunto de secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de VH y la secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 1 y 5, respectivamente.
11. Un vector de expresión que comprende un conjunto de secuencias de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 10, donde el vector codifica adicionalmente una región constante de una cadena ligera y una región constante de una cadena pesada.
12. Un conjunto de vectores de expresión que codifican un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que un vector codifica la cadena pesada del anticuerpo y el otro vector codifica la cadena ligera del anticuerpo.
13. Una célula huésped recombinante eucariota o procariota que produce un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

14. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 15. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso como un medicamento.
16. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 10 17. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, donde el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga, cáncer ovárico, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, cáncer pancreático, cáncer testicular, melanoma maligno y cáncer de tejidos blandos.
- 15 18. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, donde el anticuerpo es para el tratamiento del cáncer en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un agente quimioterápico.
- 20 19. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende células tumorales que co-expresan HER2 y EGFR y/o HER3.
- 25 20. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 19, donde el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer endometrial/de cuello uterino, cáncer de pulmón, melanoma maligno, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer testicular, un tumor de tejidos blandos tal como un sarcoma sinovial, y cáncer de vejiga.
- 30 21. Un método para la producción de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo dicho método las etapas de
- a) cultivar una célula huésped de la reivindicación 13, y
 - b) purificar el anticuerpo de la invención a partir del medio de cultivo.
- 35 22. Un método para la detección de 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 9 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y el HER2; y
 - analizar si se ha formado un complejo.
- 40 23. Un kit para la detección de la presencia de HER2 en una muestra, que comprende
- un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; e
 - instrucciones para el uso del kit.

Figura 1A

Alineamiento de VH de IgHV3-23-01 / IGHJ4 - 02 (Grupo 1)

```

IgHV1-23-01  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGSTYYADSVKG
TH1014-050  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGGTTYYADSVKG
VH1014-049  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGGTTYYADSVKG
VH1014-051  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGGTTYYADSVKG
VH1014-055  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGGTTYYADSVKG
Consenso    EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGGTTYYADSVKG

IgHV1-23-01  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-----YFDYWGQGLVTVSS
TH1014-050  RFTISRDNSKNTLQMSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGLVTVSS
VH1014-049  RFTISRDNSKNTLQMNSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGLVTVSS
VH1014-051  RFTISRDNSKNTLQMNSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGLVTVSS
VH1014-055  RFTISRDNSKNTLQMNSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGLVTVSS
Consenso    RFTISRDNSKNTLQMNSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGLVTVSS
    
```

Figura 1B

Alineamiento de VH de IgHV1-69-04 / IGHJ6 - 02 (Grupo 1)

```

IgHV1-69-04  QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIPILGIANYAQKFQG
TH1014-084  QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRINIVLGIVNHAQKFQ
Consenso    QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRINIVLGIVNHAQKFQ

IgHV1-69-04  RVTITADKSTITAYMELSLRSEDTAVYYCAR-----GMDVWGQTTTVTVSS
TH1014-084  RVTITADKSTITAYMELSLRSEDTAVYYCAREKGVDYYYGIEVWGQTTTVTVSS
Consenso    RVTITADKSTITAYMELSLRSEDTAVYYCAREKGVDYYYGIEVWGQTTTVTVSS
    
```


Figura 1C

Alineamiento de VH de IgHV1 - 18-01 / IGHJ4 - 02 (Grupo 1)

IgHV1-18-01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQLQG
TH1014-169 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWLSAYSGNTIYAQLQG
 VH1014-123 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAAGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWITTYSSNTIYAQLQG
 VH1014-161 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWLSAYSGNTIYAQLQG
 VH1014-124 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAAGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWITTYNGNTIYAQRFQD
 Consenso QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWITTYXGNTIYAQXXQG

IgHV1-18-01 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR-----YFDYWGQGLTIVTVSS
TH1014-169 RVTMTTDTSTIAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTIVTVSS
 VH1014-123 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTIVTVSS
 VH1014-161 RVTMTTDTSTIAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTIVTVSS
 VH1014-124 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTIVTVSS
 Consenso RVTMTTDTSTIAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTIVTVSS

Figura 1D

Alineamiento de VH de IgHV4-34-01 / IGHJ4-02 - (Grupo 2, N.º 1)

IgHV4-34-01 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWVIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKS
TH1014-025 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWVIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKS
 VH1014-001 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWVIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKS
 VH1014-143 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWVIRQPPGKGLEWIGEINHSGSANYNPSLMS
 VH1014-019 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWVIRQPPGKGLEWIGEINHVGSTNYNPSLKS
 VH1014-021 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWVIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKS
 VH1014-027 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYFWVIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKS
 Consenso QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYXWVIRQPPGKGLEWIGEIXHXSANYNPSLXSR

IgHV4-34-01 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR-----YFDYWGQGLTIVTVSS
TH1014-025 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYDYGYYFDYWAQGLTIVTVSS
 VH1014-001 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYDYGYYFDYWAQGLTIVTVSS
 VH1014-143 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYDYGYYFDYWAQGLTIVTVSS
 VH1014-019 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYDYGYYFDYWAQGLTIVTVSS
 VH1014-021 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYDYGYYFDYWAQGLTIVTVSS
 VH1014-027 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYDYGYYFDYWAQGLTIVTVSS
 Consenso VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYDYGYYFDYWAQGLTIVTVSS

Figura 1E

Alineamiento de VH de IgHV4-34-01 / IGHJ4-02 - (Grupo 2, N.º 2)

IgHV4-34-01 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
TH1014-091 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-032 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-035 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-036 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-054 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-094 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
Consenso QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR

IgHV4-34-01 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR-----YFDYWGQGTTLVTVSS
TH1014-091 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLYGSGIYYLDYWGQGTTLVTVSS
VH1014-032 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLYGSGIYYFDYWGQGTTLVTVSS
VH1014-035 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLYGSGIYYFDYWGQGTTLVTVSS
VH1014-036 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLYGSGIYYFDYWGQGTTLVTVSS
VH1014-054 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLYGSGIYYFDYWGQGTTLVTVSS
VH1014-094 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLYGSGIYYLDYWGQGTTLVTVSS
Consenso VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLYGSGIYYLDYWGQGTTLVTVSS

Figura 1F

Alineamiento de VH de IgHV3-30-3-01 / IGHJ4-02 - (Grupo 2)

IgHV1-30-... QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYAMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGR
TH1014-129 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYAFHWVRQAPGKLEWVAVISYDGGHKYYADSVKGR
Consenso QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYAMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGGKYYADSVKGR

IgHV3-30-... FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-----YFDYWGQGTTLVTVSS
TH1014-129 FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLGVWGFYFDYWGQGTTLVTVSS
Consenso FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLGVWGFYFDYWGQGTTLVTVSS

Figura 1G

Alineamiento de VH de IgHV3-23-01 / IGHJ4-02 - (Grupo 3a)

IgHV3-23-1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG
TH1014-098 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM~~SWVRQAPGKGLEWVSAISGSAI~~STYYADSVKG
VH1014-105 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM~~SWVRQAPGKGLEWVSAISGSAI~~STYYADSVKG
VH1014-100 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM~~SWVRQAPGKGLEWVSAISGIGY~~STYYADSVKG
VH1014-125 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM~~SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGYAT~~YYADSVKG
VH1014-162 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM~~SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGY~~STYYADSVKG
Consenso EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM~~SWVRQAPGKGLEWVSAISG~~STYYADSVKG

IgHV3-23-1 RFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAK-----YFDYWGQGLT~~VTVSS~~
TH1014-098 RFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAK~~AHYHGSGSY~~YTFDYWGQGLT~~VTVSS~~
VH1014-105 RFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAK~~AHYHGSGSY~~YTFDYWGQGLT~~VTVSS~~
VH1014-100 RFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAK~~AHYHGSGSY~~YTFDYWGQGLT~~VTVSS~~
VH1014-125 RFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAK~~GHYHGSGSY~~YTFDYWGQGLT~~VTVSS~~
VH1014-162 RFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAK~~GHYHGSGSY~~YTFDYWGQGLT~~VTVSS~~
Consenso RFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAK~~YHGSGSY~~YTFDYWGQGLT~~VTVSS~~

Figura 1H

Alineamiento de VH de IgHV5-51-01 / IGHJ2-01 - (Grupo 3a, N.º 1)

IgHV5-51-01 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS~~DRYSPSFQG~~
TH1014-127 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS~~DRYSPSFQG~~
Consenso EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS~~DRYSPSFQG~~

IgHV5-51-01 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----YFDLWGRGTL~~VTVSS~~
TH1014-127 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGD~~WSPRHWF~~DLWGRGTL~~VTVSS~~
Consenso QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGD~~WSPRHWF~~DLWGRGTL~~VTVSS~~

Figura 1I

Alineamiento de VH de IgHV5-51-01-01 / IGHJ5-02 - (Grupo 3a, N.º 2)

IgHV5-51-01 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS~~DRYSPSFQG~~
TH1014-159 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS~~DRYSPSFQG~~
Consenso EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS~~DRYSPSFQG~~

IgHV5-51-01 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----NWFDPWQGLT~~VTVSS~~
TH1014-159 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWGTYYDILTGYFNW~~DPWQGLT~~VTVSS
Consenso QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWGTYYDILTGYFNW~~DPWQGLT~~VTVSS

Figura 1J

Alineamiento de VH de IgHV1-18-01 / IGHJ6-02 - (Grupo 3b)

IgHV1-18-01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG
TH1014-132 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNINNYQKQOG
 Consenso QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNINNYQKQOG

IgHV1-18-01 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR-----GMDVWVGQTTVTVSS
TH1014-132 RVTMTTDTTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREYSYDSGTIFYFYGMDVWVGQTTVTVSS
 Consenso RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREYSYDSGTIFYFYGMDVWVGQTTVTVSS

Figura 1K

Alineamiento de VH de IgHV3-30-3-01 / IGHJ4-02 - (Grupo 3b)

IgHV3-30... QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
TH1014-153 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYVTHHWVRQAPGKGLEWTVVISYDGSNKYYADSVKG
 VH1014-033 QVQLVESGGGVVQIGRSLRLSCAASGFTFSSHAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
 VH1014-160 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSHAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
 VH1014-166 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
 VH1014-152 QVQVVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
 VH1014-167 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYATHHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
 Consenso QVQLVESGGGVVQIGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG

IgHV3-30... RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-----YFDYWGQGLTVTVSS
TH1014-153 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGITGTVGFDYWGQGLTVTVSS
 VH1014-033 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYISSGTVGFDYWGQGLTVTVSS
 VH1014-160 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSIIGSTGTVGFDYWGQGLTVTVSS
 VH1014-166 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSIIGSTGTVGFDYWGQGLTVTVSS
 VH1014-152 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSIIGSTGTVGFDYWGQGLTVTVSS
 VH1014-167 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSIIGSTGTVGFDYWGQGLTVTVSS
 Consenso RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSIIGSTGTVGFDYWGQGLTVTVSS

Figura 2A

Alineamiento de VL de IgKV1-12-01 / IGKJ5-01 (Grupo 1)

IgKV1-12-01 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-050 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG
VL1014-084 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQKPGKAPKLLIYVASTLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-049 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG
 VL1014-051 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG
 VL1014-055 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG
 Consenso DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQKPGKAPKLLIYKASLQSGVPSRFSGSG

IgKV1-12-01 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQTRLEIK
VL1014-050 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQTRLEIK
VL1014-084 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPITFGGTRKVEIK
 VL1014-049 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQTRLEIK
 VL1014-051 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQTRLEIK
 VL1014-055 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQTRLEIK
 Consenso SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPITFGGTRKVEIK

Figura 2B

Alineamiento de VL de IgKV3-11-01 / IGKJ1-01 (Grupo 1)

IgKV3-11-01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSG
VL1014-169 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSG
 VL1014-124 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSG
 VL1014-161 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSG
 VL1014-123 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSG
 Consenso EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSG

IgKV3-11-01 SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
VL1014-169 SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
 VL1014-124 SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
 VL1014-161 SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
 VL1014-123 SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
 Consenso SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK

Figura 2C

Alineamiento de VL de IgKV1D-16-01 / IGKJ5-01 (Grupo 2, N.º 1)

IgKV1D-16 ... DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-025 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-001 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-019 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-143 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-021 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-027 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 Consenso DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG

IgKV1D-16 ... SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQTRLEIK
VL1014-025 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQTRLEIK
 VL1014-001 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYISFPITFGQTRLEIK
 VL1014-019 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQTRLEIK
 VL1014-143 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQTRLEIK
 VL1014-021 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQTRLEIK
 VL1014-027 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQTRLEIK
 Consenso SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPITFGQTRLEIK

Figura 2D

Alineamiento de VL de IgKV1D-16-01 / IGKJ1-01 (Grupo 2, N.º 2)

IgKV1D-16 ... DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-091 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-032 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-035 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-036 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-054 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-094 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 Consenso DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG

IgKV1D-16 ... SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPWTFGQGTKVEIK
VL1014-091 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
 VL1014-032 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
 VL1014-035 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
 VL1014-036 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
 VL1014-054 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
 VL1014-094 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
 Consenso SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK

Figura 2E

Alineamiento de VL de IgKV1D-16-01 / IGKJ5-01 (Grupo 3a)

IgKV1D-16 ... DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-098 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-100 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-105 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-125 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-162 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 Consenso DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG

IgKV1D-16 ... SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
VL1014-098 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
 VL1014-100 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
 VL1014-105 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
 VL1014-125 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
 VL1014-162 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
 Consenso SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK

Figura 2F

Alineamiento de VL de IgKV1D-16-01 / IGKJ5-01 (Grupo 3b)

IgKV1D-16 ... DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-153 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-152 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-166 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-167 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-160 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 VL1014-033 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
 Consenso DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG

IgKV1D-16 ... SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-153 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
 VL1014-152 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
 VL1014-166 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
 VL1014-167 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
 VL1014-160 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
 VL1014-033 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
 Consenso SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK

Figura 3A

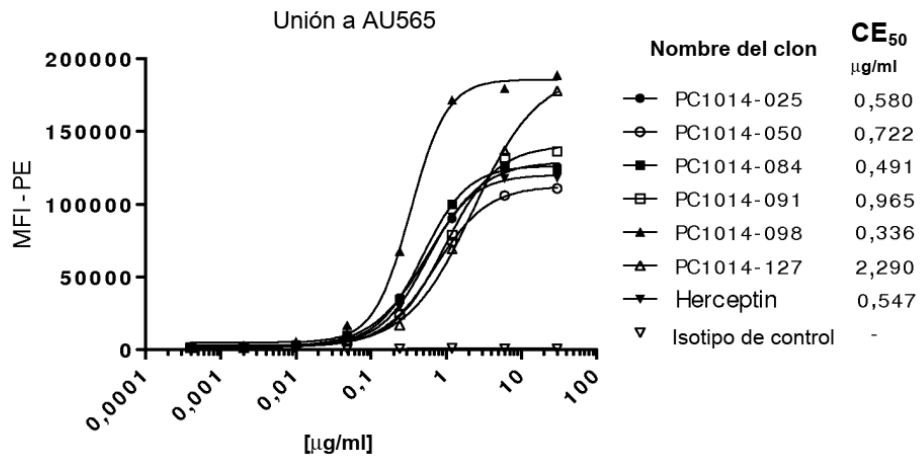


Figura 3B

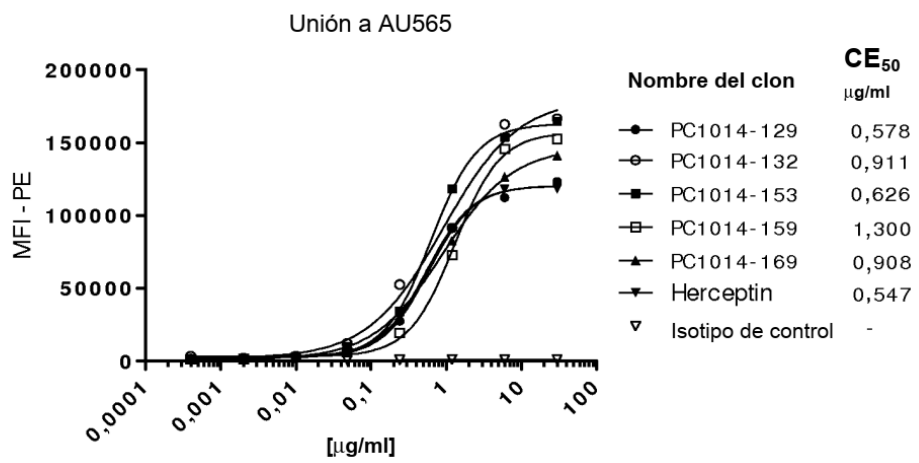


Figura 3C

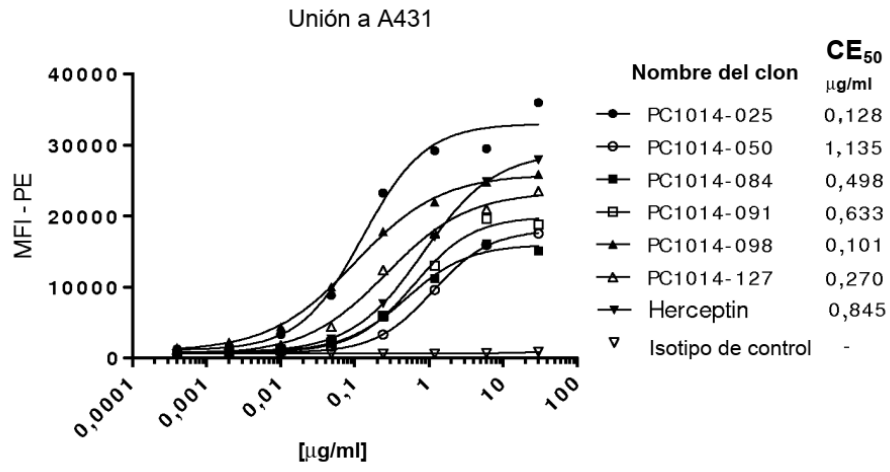


Figura 3D

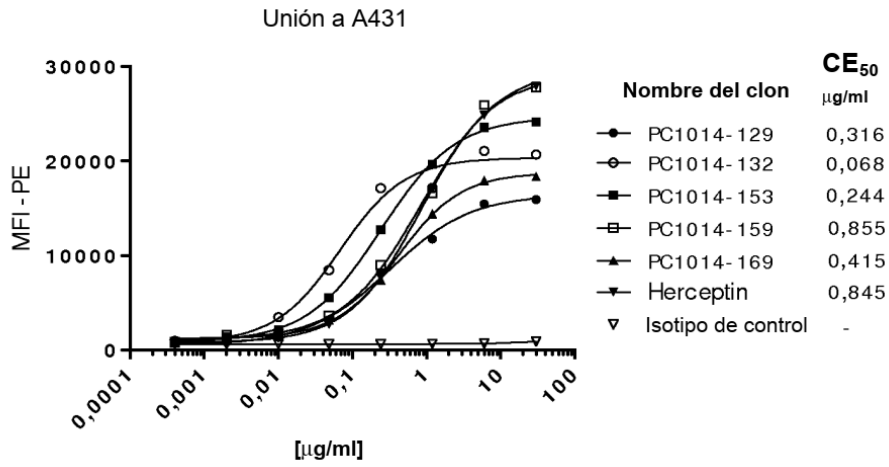


Figura 4

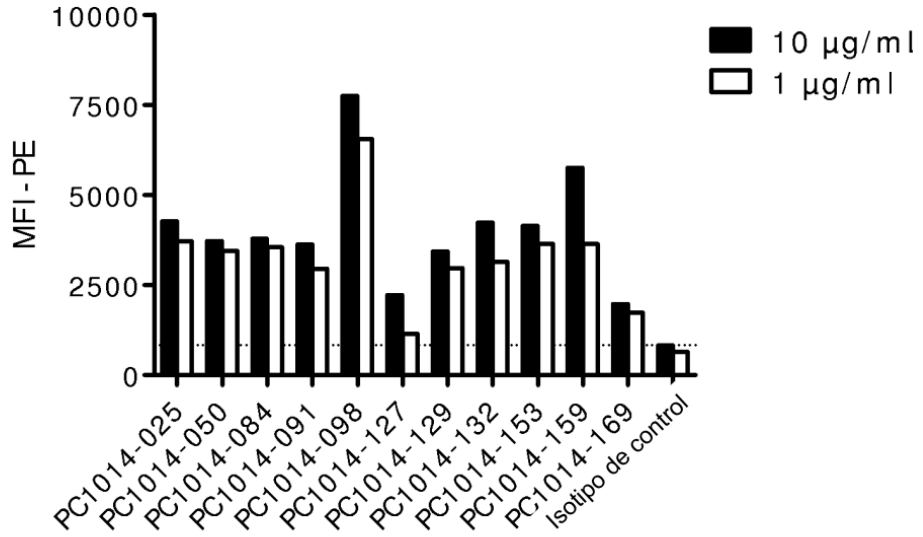


Figura 5

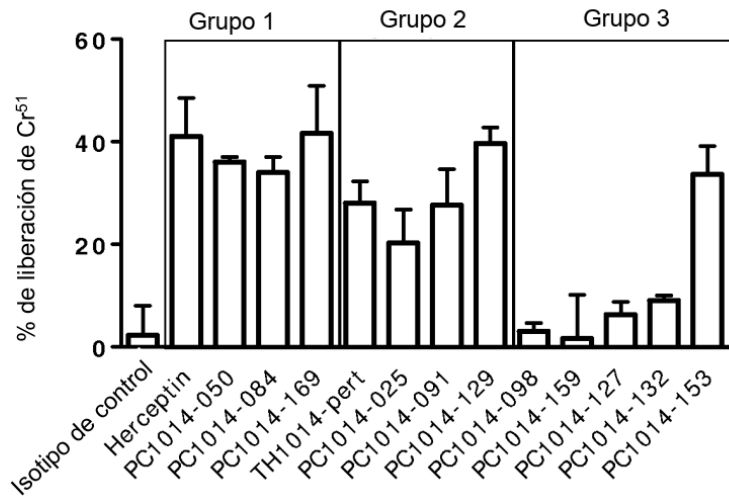


Figura 6

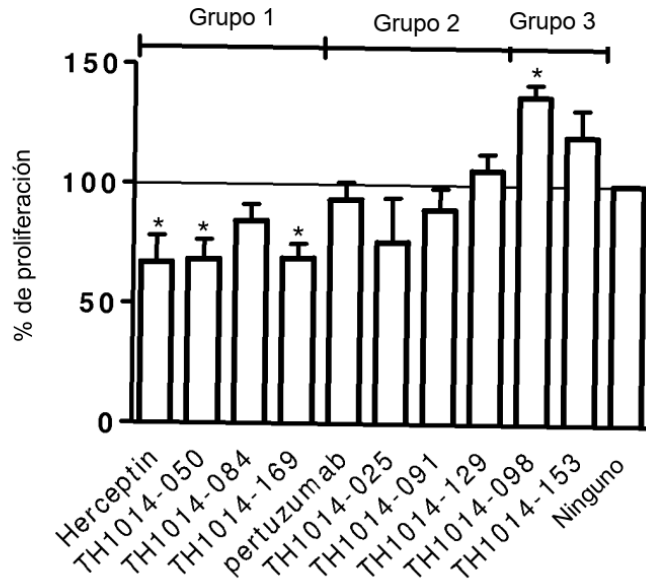


Figura 7

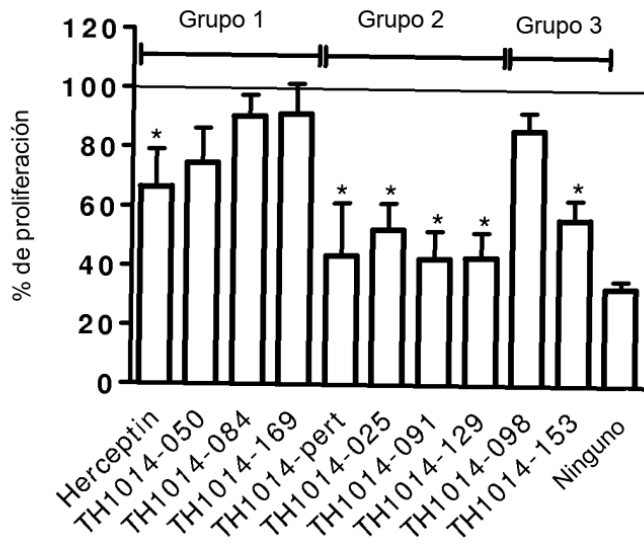


Figura 8A

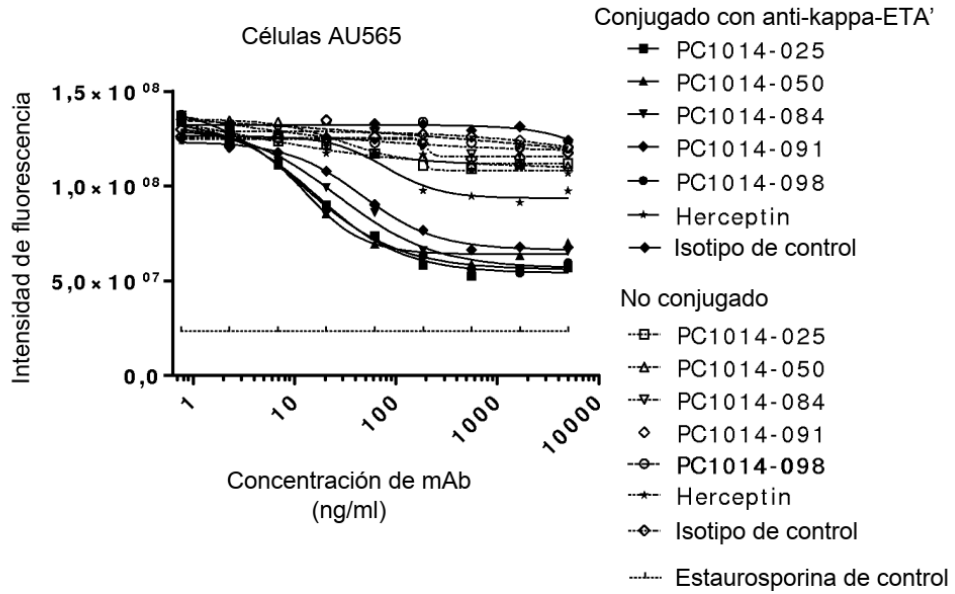


Figura 8B

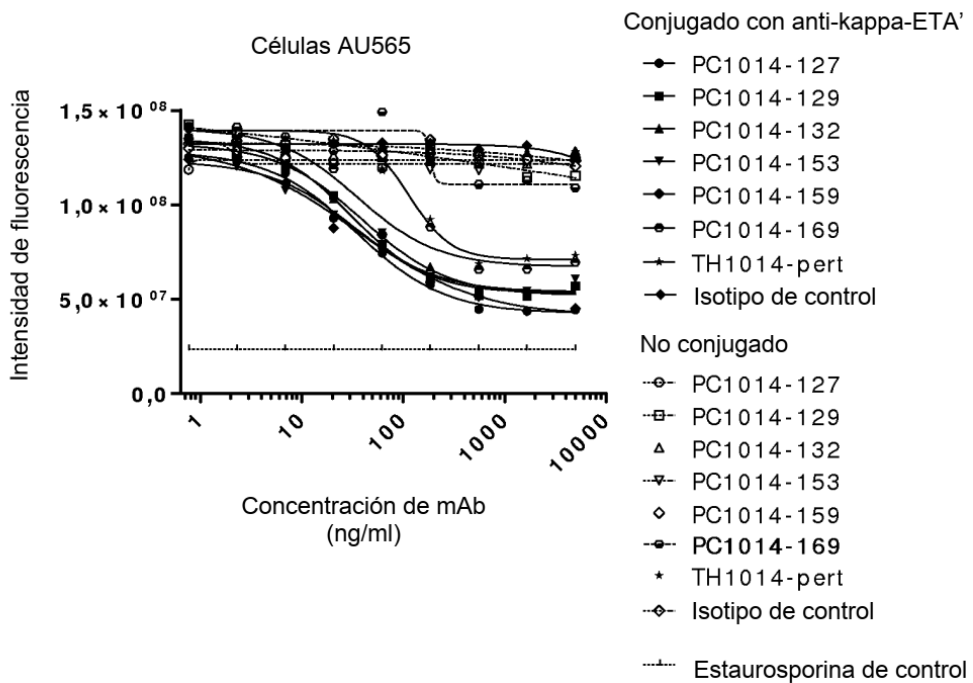


Figura 8C

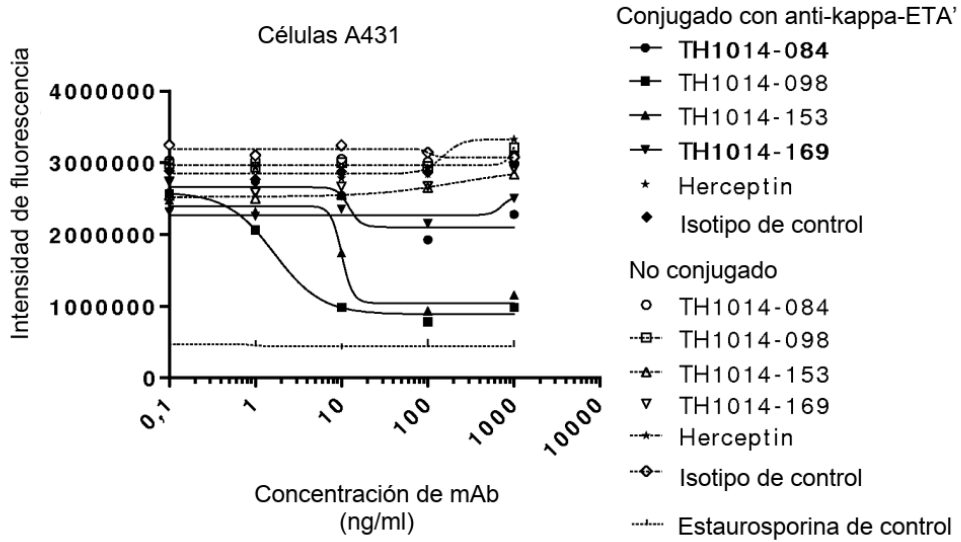


Figura 8D

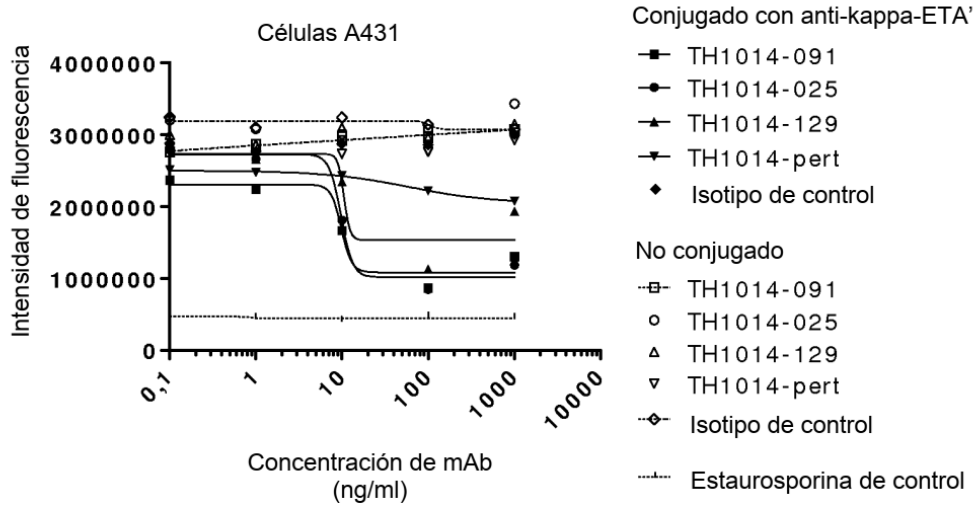


Figura 9

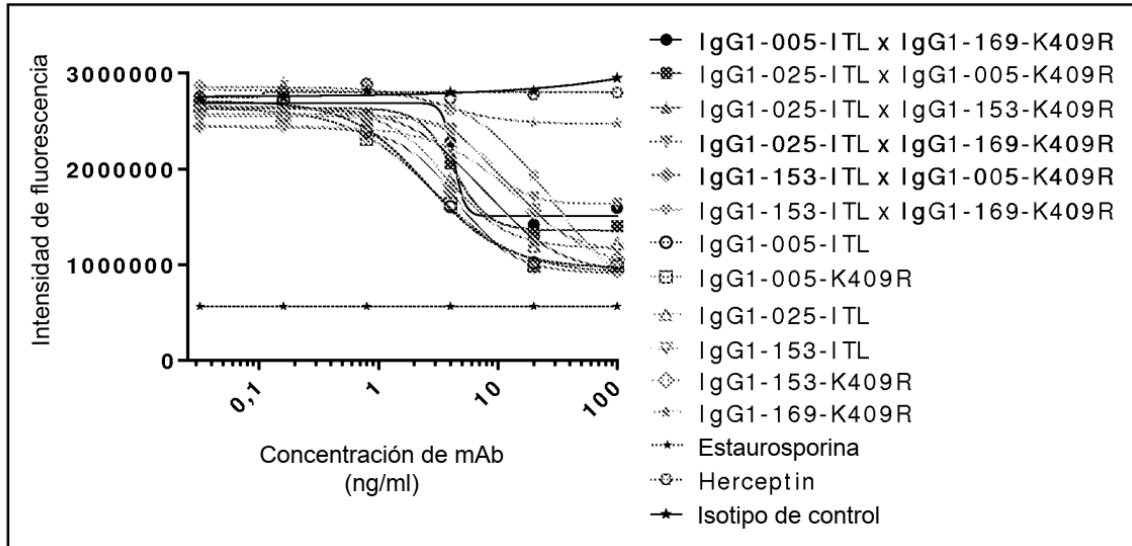


Figura 10

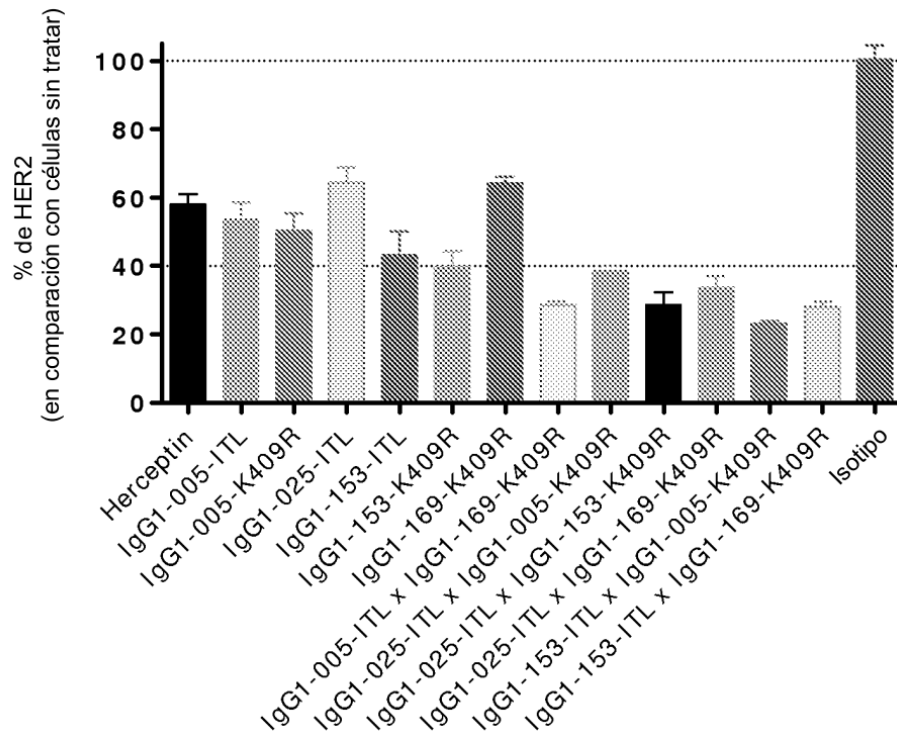
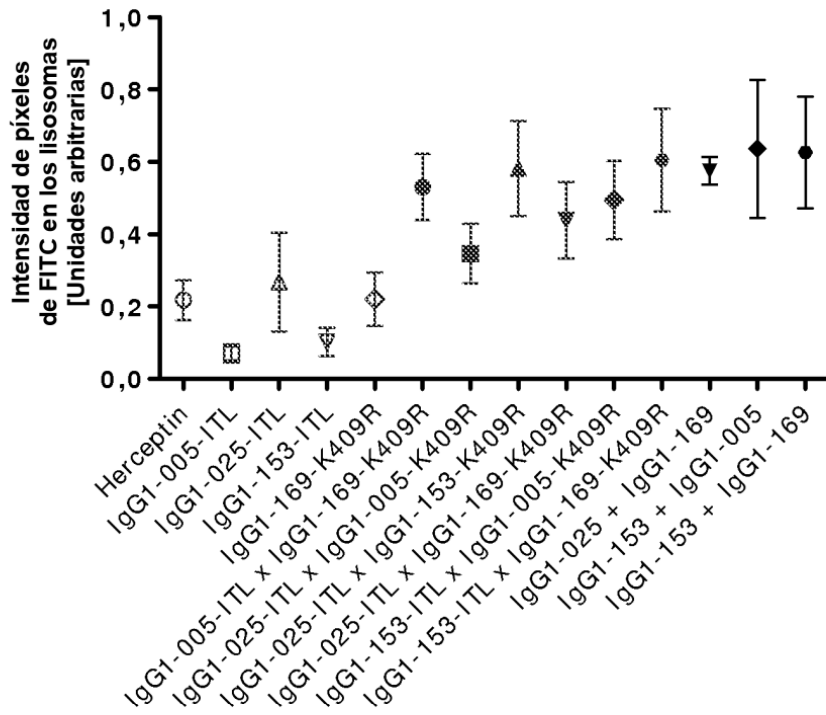


Figura 11

A



B

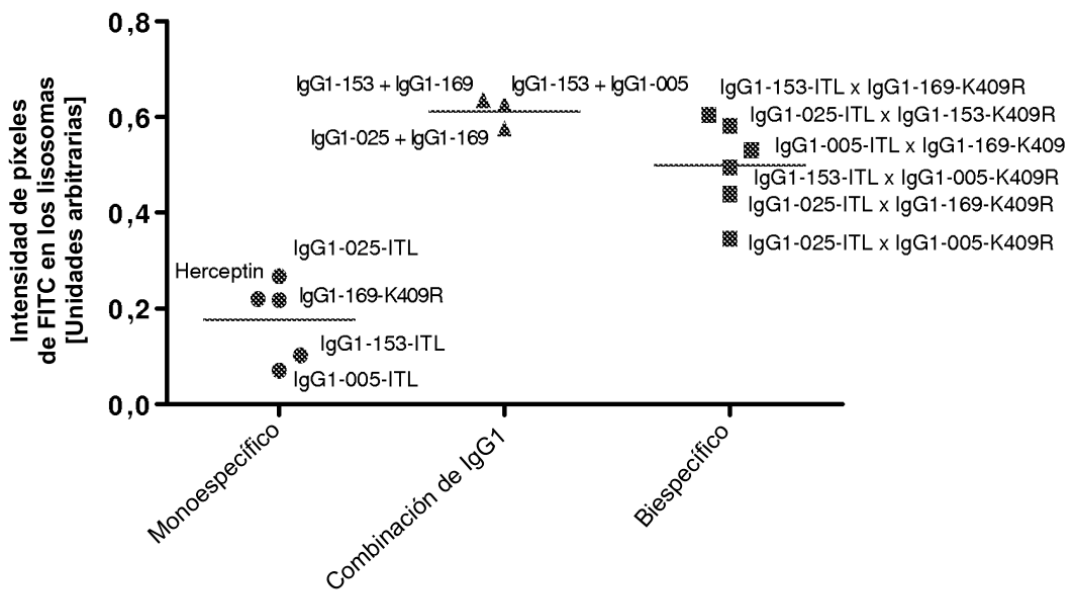


Figura 12

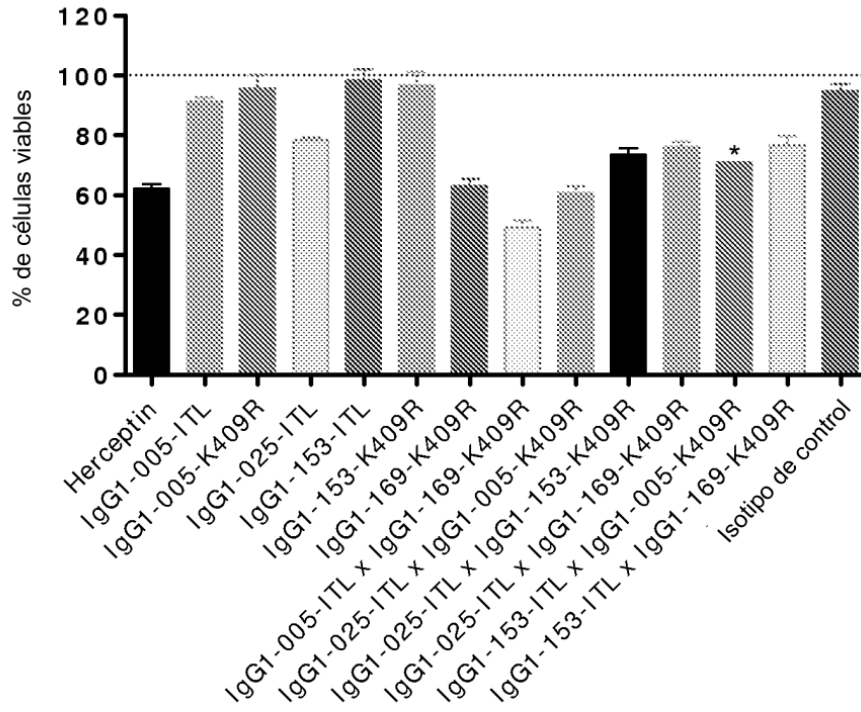


Figura 13

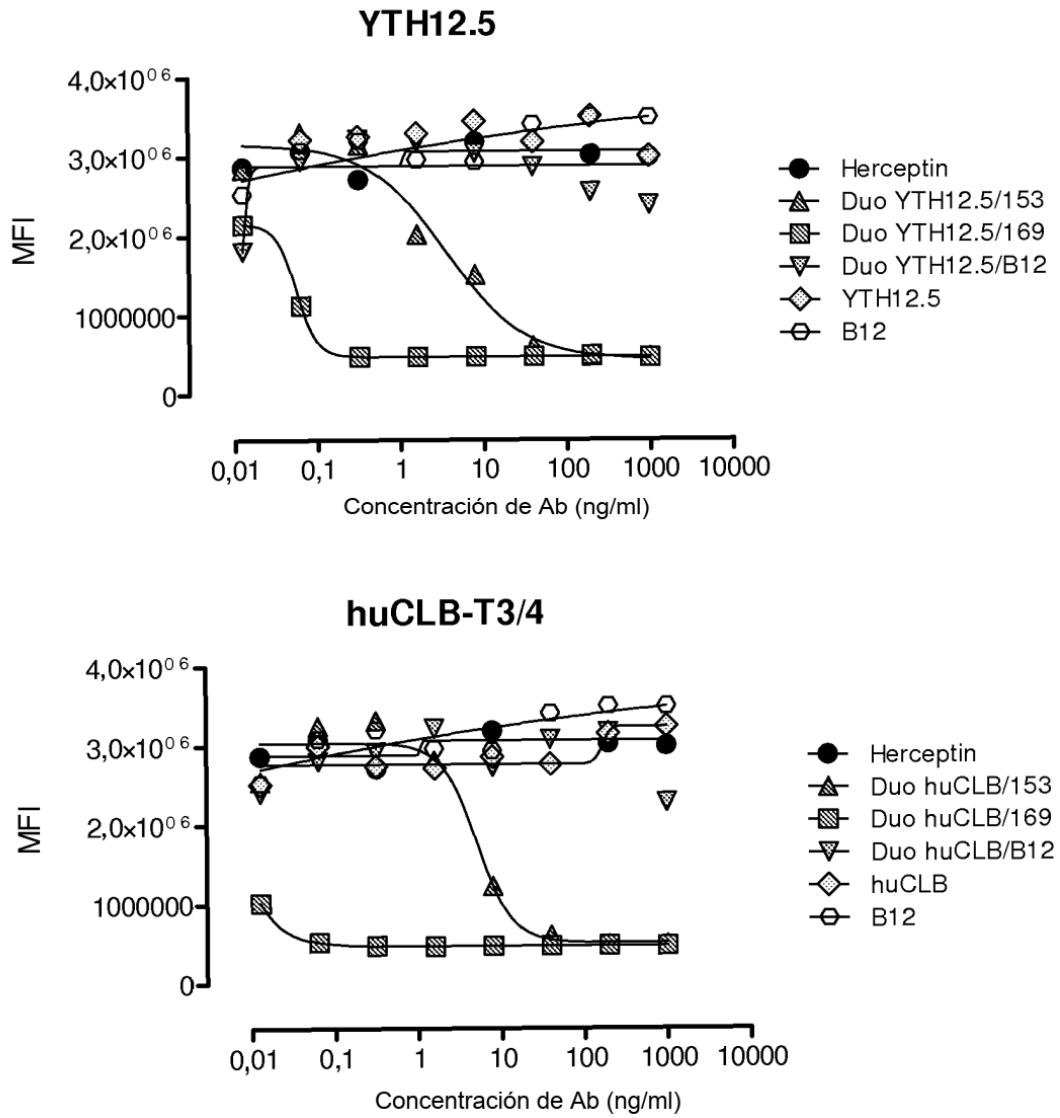


Figura 13 (continuación)

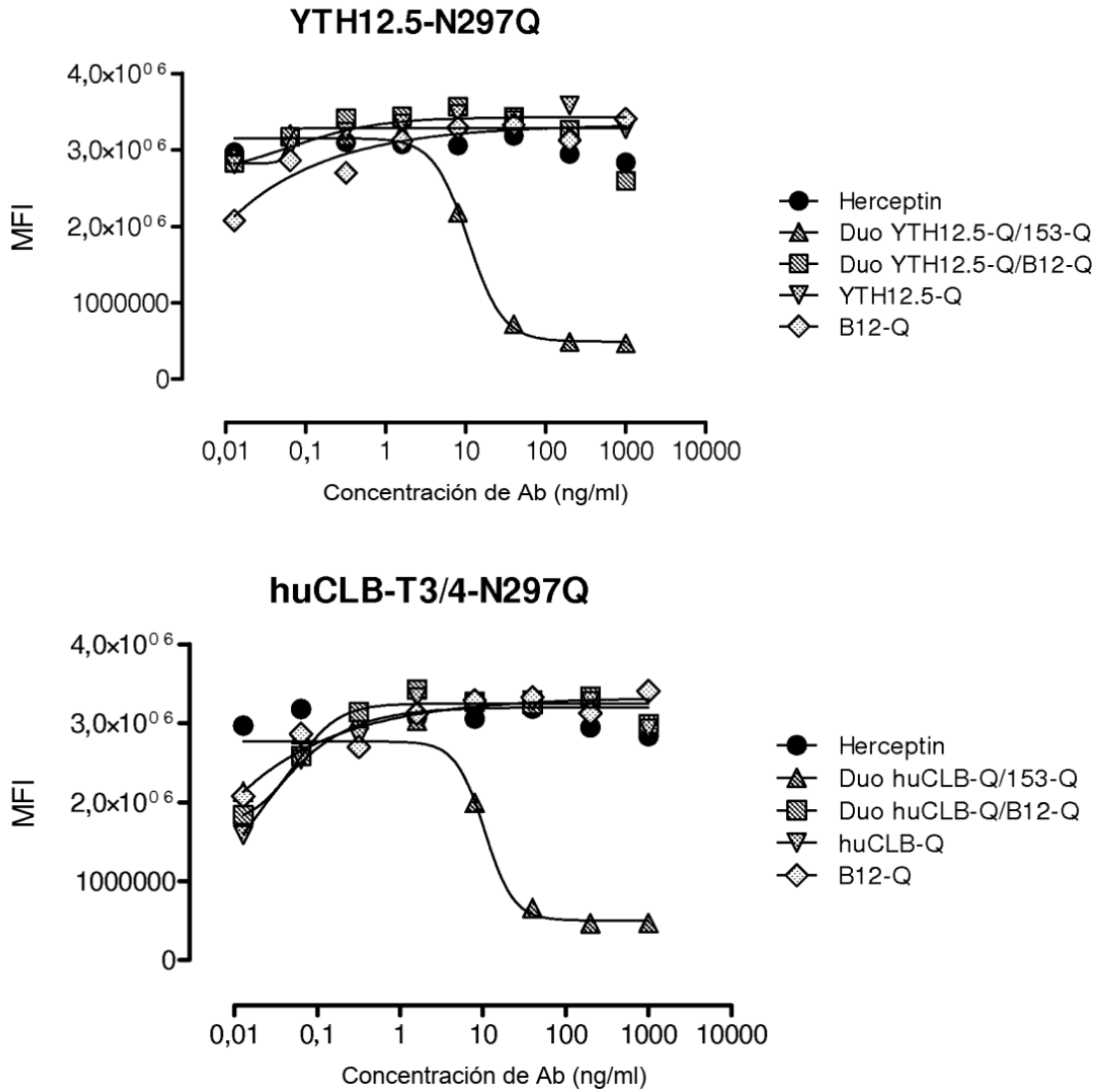


Figura 14

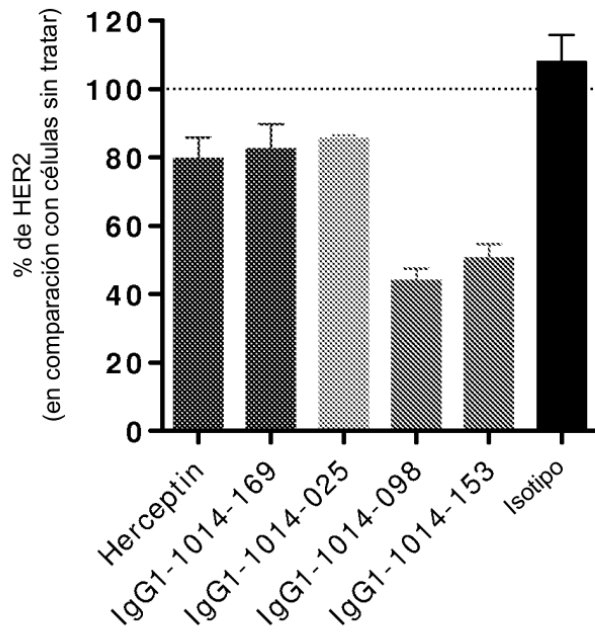


Figura 15

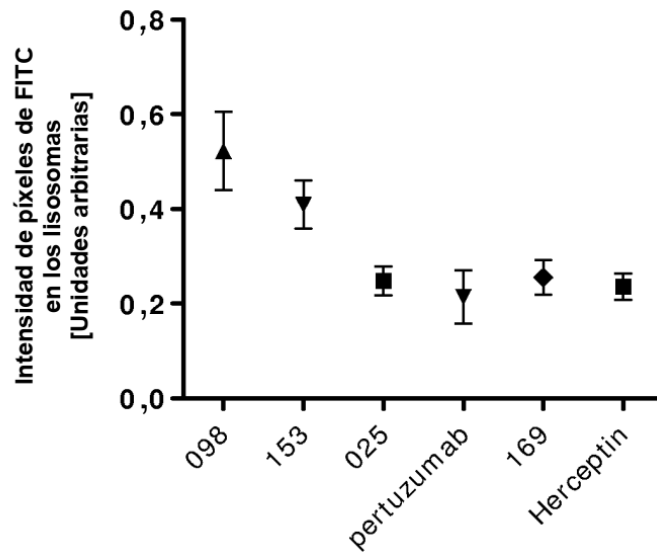


Figura 16

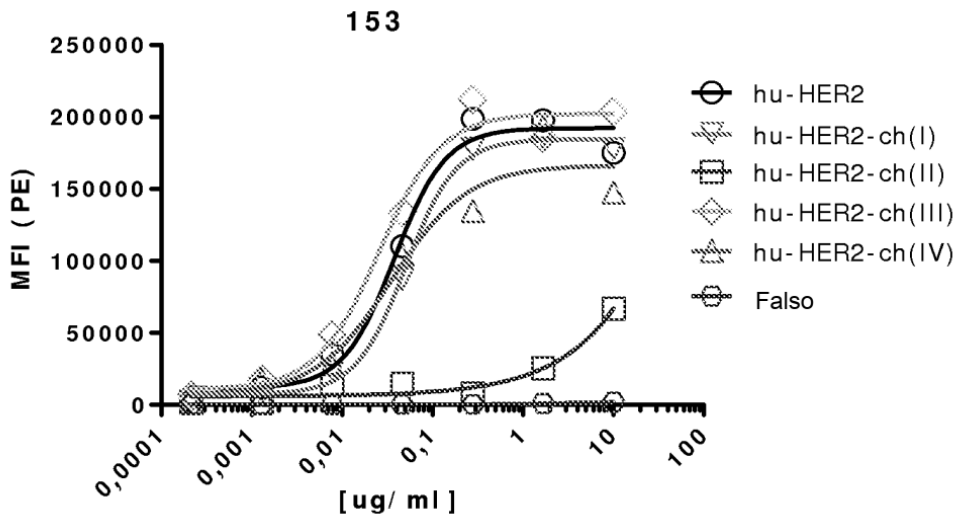


Figura 17A

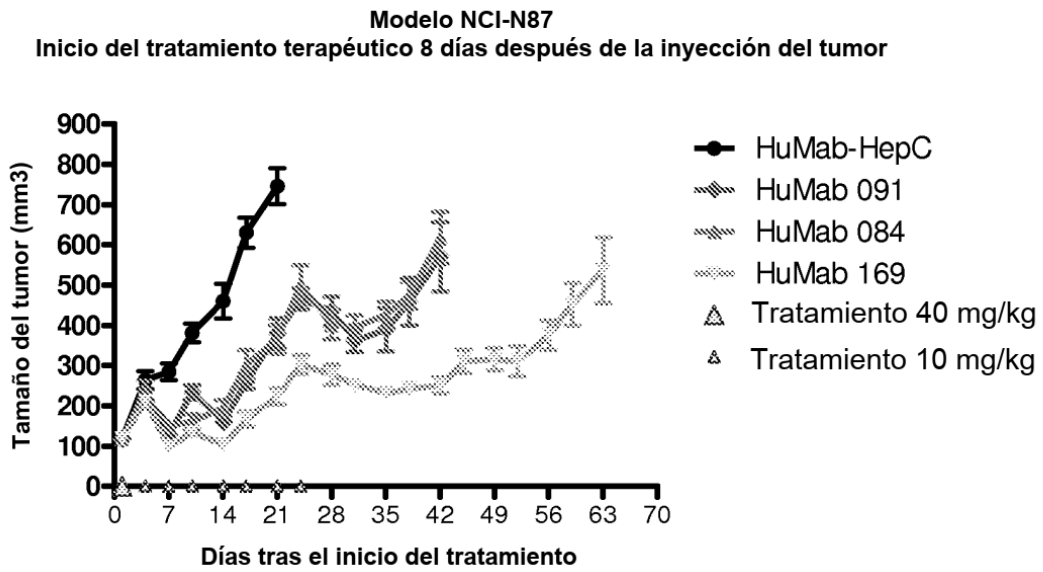


Figura 17B

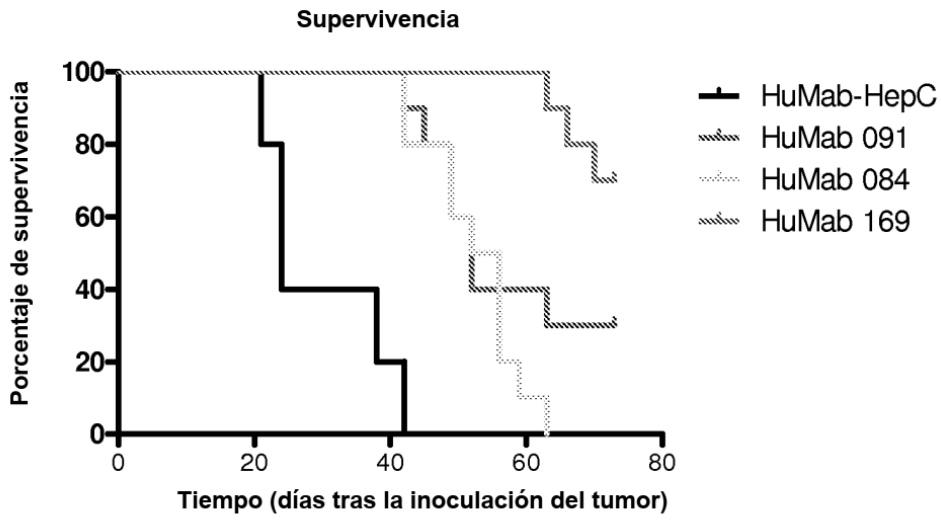


Figura 18A

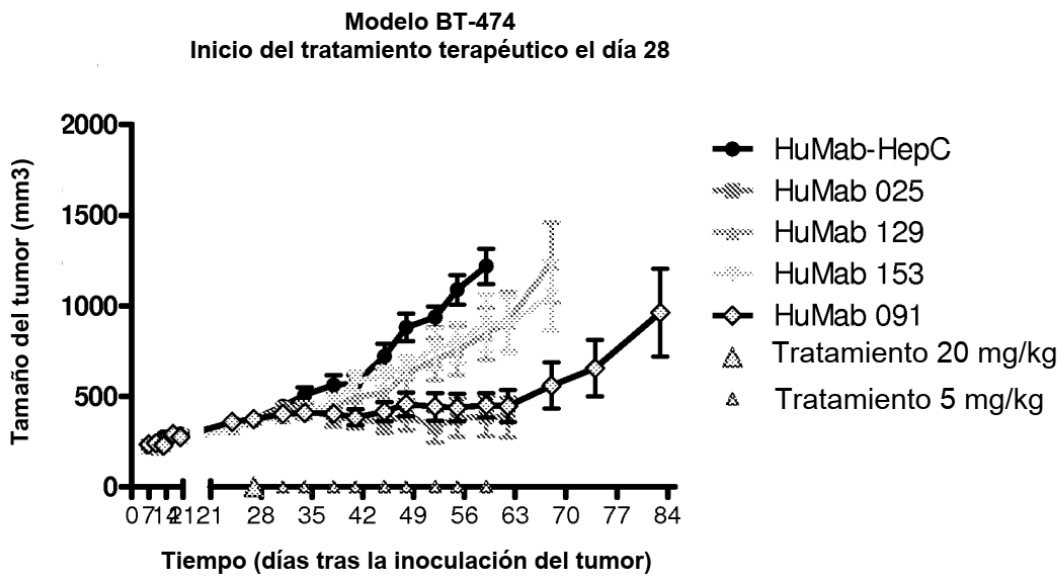


Figura 18B

