(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 745 684**

(51) Int. CI.:

C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2012 PCT/US2012/066038**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13078191**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2012 E 12852317 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2797957**

(54) Título: **Moléculas de unión específicas para HER3 y usos de las mismas**

(30) Prioridad:

23.11.2011 US 201161563092 P
07.06.2012 US 201261656670 P
05.11.2012 US 201261722558 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2020

(73) Titular/es:

MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
One MedImmune Way
Gaithersburg, MD 20878, US

(72) Inventor/es:

CHOWDHURY, PARTHA S.;
TICE, DAVID;
XIAO, ZHAN;
STEINER, PHILIPP;
KINNEER, KRISTA y
REBELATTO, MARLON

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

Moléculas de unión específicas para HER3 y usos de las mismas

Referencia a la lista de secuencias presentada electrónicamente

Esta solicitud incorpora por referencia una lista de secuencias presentada con esta solicitud como un archivo de texto titulado “Her3-100WO1_SL” creado el 12 de noviembre de 2012 y que tiene un tamaño de 31,3 kilobytes.

Campo de la invención

La presente invención proporciona composiciones que se unen específicamente a HER3 y tales composiciones para su uso en el tratamiento de cáncer.

Antecedentes de la técnica

El receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico (HER3, también conocido como Erbb3) es una proteína tirosina receptora y pertenece a la subfamilia EGFR/HER del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de los receptores de proteína tirosina cinasas (RTK), que consisten en EGFR (HER1/Erbb1), HER2/Erbb2, HER3/Erbb3 y HER4/Erbb4. EGFR y HER2 están entre los RTK oncogénicos mejor establecidos que impulsan la tumorigénesis de múltiples tipos de tumores sólidos, incluyendo categorías principales tales como cánceres de mama, colorrectal y de pulmón. Las actividades de tirosina cinasa de EGFR y HER2 han demostrado ser esenciales para sus actividades oncogénicas.

Como el EGFR prototípico, el receptor transmembranario HER3 consiste en un dominio de unión a ligando extracelular (ECD), un dominio de dimerización dentro del ECD, un dominio transmembranario, y un dominio de proteína tirosina cinasa intracelular (TKD) y un dominio de fosforilación C-terminal (véase, por ejemplo, Kim *et al.* (1998), Biochem. J. 334, 189-195; Roepstorff *et al.* (2008) Histochem. Cell Biol. 129, 563-578).

El ligando herregulina (HRG) se une al dominio extracelular de HER3 y activa la ruta de señalización mediada por el receptor promoviendo la dimerización con otros miembros de la familia de EGFR (por ejemplo, otros receptores HER) y la transfosforilación de su dominio intracelular. HER3 ha demostrado que carece de actividad de tirosina cinasa detectable, probablemente debido a un reemplazo no conservativo de determinados residuos clave en el dominio de tirosina cinasa. Por tanto, una consecuencia de esta deficiencia de cinasa, HER3 necesita formar heterodímeros con otros RTK, especialmente EGFR y HER2, para someterse a fosforilación y ser funcionalmente activo.

El papel central para HER3 en la oncogénesis es actuar como una proteína de armazón para permitir la máxima inducción de la ruta PI3K/AKT. HER3 ha demostrado que contiene una agrupación de seis motivos que contienen tirosina C-terminales que cuando se fosforilan, imitan el sitio de unión consenso PI3K/p85. Por tanto, formando heterodímeros con HER3, los iniciadores oncogénicos en el sentido 5’, EGFR, HER2, cMET y FGFR2, pueden acoplarse de manera más eficiente a la ruta PI3K/AKT. Por tanto, es razonable esperar que una pérdida de la actividad de HER3 pueda bloquear la progresión del cáncer en diversos sistemas impulsados por RTK divergentes. Los estudios han demostrado que el silenciamiento del ARNip de HER3 en células de cáncer de mama amplificado por HER2 condujo a efectos de antiproliferación similares al silenciamiento del ARNip de HER2, demostrando además la necesidad crítica del cáncer de HER3.

Además de promover el crecimiento tumoral en condiciones no estresantes, se ha encontrado que HER3 está muy implicado en conferir resistencias terapéuticas a muchos fármacos con diana específica, incluyendo inhibidores de tirosina cinasa EGFR, anticuerpos monoclonales contra HER2 tales como trastuzumab, así como inhibidores de molécula pequeña de PI3K o AKT o MEK. Esto añade otra capa de atracción para HER3 como una diana para el cáncer prometedora tanto para la citorredección quirúrgica de tumores primarios así como para combatir las cuestiones relacionadas con la resistencia al cáncer que surgen de manera invariable a pesar de las respuestas clínicas iniciales.

HER3 tiene dos modos diferentes para dimerizarse con su pareja RTK: dependiente del ligando (en presencia de HRG) o independiente del ligando. En cuanto a los dímeros HER2-HER3, se conoce que en células con de baja a media expresión de HER2, HER3 sólo puede complejarse con HER2 después de la unión a ligando; por el contrario, en células con HER2 amplificado (HER2 IHC 3+), forman dímeros espontáneos sin HRG (Junttila *et al.* (2009) Cancer Cell. 15(5):429-40). Los dímeros formados en presencia o ausencia del ligando son estructuralmente distintos tal como se demostró por un estudio anterior que mostraba que trastuzumab/Herceptin® (anticuerpo monoclonal contra HER2 de Genentech/Roche aprobado para cánceres de mama con HER2 3+) sólo puede alterar al dímero independiente del ligando pero no al dímero dependiente del ligando, mientras que pertuzumab\Omnitarg® (rhuMAb 2C4, anticuerpo monoclonal contra HER2 de Genentech/Roche en ensayos de fase 3) sólo puede alterar a los dímeros dependientes del ligando.

La formación de dímeros entre miembros de la familia de HER expande el potencial de señalización de HER3 y es un medio no solo para la diversificación de señales sino también para la amplificación de señales. HER3 ha demostrado fosforilarse en una variedad de contextos celulares. Por ejemplo, HER3 se fosforila de manera constitutiva en residuos de tirosina en un subconjunto de células de cáncer de mama humano que sobreexpresan HER3 (véase, por ejemplo, Kraus *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2900-2904; Kim *et al.* (1998), Biochem. J. 334, 189-195; Schaefer *et al.* (2004) Cancer Res. 64, 3395-3405; Schaefer *et al.* (2006) Neoplasia 8, 612-622). Por consiguiente, son deseables terapias que interfieran de manera eficaz con la fosforilación de HER3.

Además, se ha encontrado que HER3 se sobreexpresa y/o sobreactiva en varios tipos de cánceres tales como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cánceres de riñón y vejiga urinaria, cánceres de páncreas, cánceres cerebrales, neoplasias hematopoyéticas, retinoblastomas, melanomas, cánceres colorrectales, cánceres gástricos, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, etc. (véase, por ejemplo, Sithanandam y Anderson (2008) Cancer Gene Ther. 15, 413-448). En general, HER3 se activa de manera frecuente en cánceres que expresan EGFR, HER2, C-Met y FGFRII.

Se ha demostrado una correlación entre la expresión de HER2/HER3 y la progresión desde un estadio no invasivo hasta un estadio invasivo (Alimandi *et al.*, Oncogene 10, 1813-1821; DeFazio *et al.*, Cancer 87, 487-498; Naidu *et al.*, Br. J. Cancer 78, 1385-1390). Por tanto, HER3 puede usarse como un marcador diagnóstico para la agresividad tumoral aumentada y supervivencia deficiente. Se ha demostrado de manera repetitiva que la activación sostenida de HER3 de PI3K/AKT explica la resistencia tumoral para inhibidores de EGFR/HER2.

Aunque se ha explorado el papel de HER3 en el desarrollo y la progresión del cáncer (véase, por ejemplo, Horst *et al.* (2005) Int. J. Cancer 115, 519-527; Xue *et al.* (2006) Cancer Res. 66, 1418-1426), HER3 permanece subestimado en gran medida como una diana para la intervención clínica. La mayoría de las inmunoterapias actuales se centran principalmente en inhibir la acción de HER2 y, en particular, la heterodimerización de complejos HER2/HER3 (véase, por ejemplo, Sliwkowski *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269, 14661-14665). Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar agentes inmunoterapéuticos mejorados que inhiban de manera eficaz la señalización celular mediada por HER3 que puedan usarse para el diagnóstico, la predicción del pronóstico y el tratamiento de una variedad de cánceres.

El documento WO2010/127181 da a conocer anticuerpos que se unen específicamente a HER3 acoplado con herregulina en un sitio distinto del sitio de unión de la herregulina que se informan que son particularmente útiles para tratar el cáncer.

Sala *et al.* (Oncogene (2012) 31 1275-1286) dan a conocer el anticuerpo de HER3 MP-RM-1 que según se informa inhibe el crecimiento tumoral inhibiendo la activación dependiente e independiente del ligando de la señalización de ErbB3/Akt.

El documento WO2011/044311 da a conocer anticuerpos específicos contra HER3 que según se informa pueden usarse en el tratamiento o diagnóstico de trastornos oncogénicos hiperproliferativos patológicos asociados con la expresión anómala de HER3 o HER2 que incluye la activación anómala de cada uno de estos receptores.

El documento WO2011/136911 da a conocer anticuerpos monoclonales que se informan que se unen e inhiben la activación de HER3 que puede ser útil en el tratamiento de cáncer.

Van der Horst *et al.* (Int J. Cancer, 115, 519-527 (2005)) da a conocer un análisis científico de la señalización mediada por HER3 en líneas celulares de cáncer de mama resistentes a anticuerpos anti-Her2.

Breve sumario de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 que comprende una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, que comprende una VL que comprende SEQ ID NO: 3 y una VH que comprende SEQ ID NO: 2. Las realizaciones preferidas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se describen por ejemplo en las reivindicaciones dependientes 2 a 8. La presente invención también se refiere a una composición que comprende el anticuerpo de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos. La presente invención también se refiere a una célula huésped que comprende dicha secuencia de ácidos nucleicos o dicho vector. Además, la presente invención se refiere a un método de obtención del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención, que comprende (a) cultivar la dicha célula huésped; y (b) aislar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En un aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la presente invención o la composición según la presente invención. En otro aspecto, la presente invención se refiere al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención para su uso en la reducción de la proliferación celular, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a HER3. En aún un aspecto adicional, la presente

invención se refiere al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención. Además, la presente invención se refiere al anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la presente invención para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer agente que es el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, que es un agente antineoplásico distinto del primer agente.

La divulgación proporciona moléculas de unión anti-HER3, es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales que pueden suprimir la actividad de HER3 en contextos tanto dependientes como independientes del ligando. Por el contrario, otros anticuerpos monoclonales anti-HER3 en la técnica (por ejemplo, Ac n.º 6 (publicación de patente internacional WO 2008/100624) y U1-59 (publicación de patente internacional WO 2007077028; también denominado en el presente documento AMG), sólo pueden suprimir la actividad dependiente de ligando de HER3. También se dan a conocer anticuerpos anti-HER3 madurados por afinidad con potencia aumentada y semivida extendida que, por consiguiente, pueden administrarse de manera menos frecuente, a un intervalo aumentado entre dosis, y en menores volúmenes de dosis. La divulgación también proporciona un anticuerpo anti-HER3 para su uso en el tratamiento de enfermedades tales como cáncer en un sujeto humano que comprende la administración de un anticuerpo anti-HER3. En algunos aspectos específicos se usa un anticuerpo humano mutante YTE derivado de 2C2.

La divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a un epítopo dentro del dominio extracelular de HER3, en el que el anticuerpo se une específicamente al mismo epítopo de HER3 como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende la región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL) de CL16 o de 2C2. Además, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3, e inhibe de manera competitiva la unión de HER3 por un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende la VH y VL de CL16 o de 2C2.

La divulgación también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VL de anticuerpo, en el que la VL comprende la secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos:

$[FW_1]X1GSX2SNIGLNYVS[FW_2]RNNQRPS[FW_3]AAWDDX_3X_4X_5GEX_6[FW_4]$

en la que $[FW_1]$, $[FW_2]$, $[FW_3]$ y $[FW_4]$ representan regiones de entramado de VL, y en la que

1. (a) X_1 representa residuos de aminoácido arginina (R) o serina (S),
2. (b) X_2 representa residuos de aminoácido serina (S) o leucina (L),
3. (c) X_3 representa residuos de aminoácido serina (S) o glicina (G),
4. (d) X_4 representa residuos de aminoácido leucina (L) o prolina (P),
5. (e) X_5 representa residuos de aminoácido arginina (R), isoleucina (I), prolina (P) o serina (S), y
6. (f) X_6 representa residuos de aminoácido valina (V) o alanina (A).

Además, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VH de anticuerpo, en el que la VH comprende la secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos:

$[FW_5]YYYMQ[FW_6]X_7IGSSGGVTNYADSVKG[FW_7]VGLGDAFDI[FW_8]$

en la que $[FW_5]$, $[FW_6]$, $[FW_7]$ y $[FW_8]$ representan regiones de entramado de VH, y en la que X_7 representa residuos de aminoácido tirosina (Y), isoleucina (I) o valina (V).

La divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VL de anticuerpo y una VH de anticuerpo, en el que la VL comprende la secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos:

$[FW_1]X_1GSX_2SNIGLNYVS[FW_2]RNNQRPS[FW_3]AAWDDX_3X_4X_5GEX_6[FW_4]$

en la que $[FW_1]$, $[FW_2]$, $[FW_3]$ y $[FW_4]$ representan regiones de entramado de VL, y en la que

1. (a) X_1 representa residuos de aminoácido arginina (R) o serina (S),

2. (b) X_2 representa residuos de aminoácido serina (S) o leucina (L),

3. (c) X_3 representa residuos de aminoácido serina (S) o glicina (G),

4. (d) X_4 representa residuos de aminoácido leucina (L) o prolina (P),

5. (e) X_5 representa residuos de aminoácido arginina (R), isoleucina (I), prolina (P) o serina (S), y

6. (f) X_6 representa residuos de aminoácido valina (V) o alanina (A), y

en el que la VH comprende la secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos:

$[FW_5]YYYMQ[FW_6]X_7IGSSGGVTNYADSVKG[FW_7]VGLGDAFDI[FW_8]$

en la que $[FW_5]$, $[FW_6]$, $[FW_7]$ y $[FW_8]$ representan regiones de entramado de VH, y en la que X_7 representa residuos de aminoácido tirosina (Y), isoleucina (I) o valina (V).

La divulgación también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VL de anticuerpo, en el que la VL comprende una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de complementariedad de VL (VL-CDR1) idéntica a, o idéntica excepto por cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos a: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20. Además, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VL de anticuerpo, en el que la VL comprende una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de complementariedad de VL (VL-CDR2) idéntica a, o idéntica excepto por cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos a SEQ ID NO: 21.

Además, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VL de anticuerpo, en el que la VL comprende una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de la región 3 determinante de complementariedad de VL (VL-CDR3) idéntica a, o idéntica excepto por cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos a: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 30. Además, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VH de anticuerpo, en el que la VH comprende una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de complementariedad (VH-CDR1) idéntica a, o idéntica excepto por cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos a SEQ ID NO: 31.

Además, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VH de anticuerpo, en el que la VH comprende una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de complementariedad (VH-CDR2) idéntica a, o idéntica excepto por cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos a: SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34. Además, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VH de anticuerpo, en el que la VH comprende una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de la región 3 determinante de complementariedad (VH-CDR3) idéntica a, o idéntica excepto por cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos a SEQ ID NO: 35.

La divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VL de anticuerpo, en el que la VL comprende secuencias de aminoácidosecuencias de aminoácidos de VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 idénticas a, o idénticas excepto por cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos en una o más de las VL-CDR a: las SEQ ID NO: 18, 21 y 22, las SEQ ID NO: 18, 21 y 26, las SEQ ID NO: 18, 21 y 27 , las SEQ ID NO: 20, 21 y 22, las SEQ ID NO: 19, 21 y 22, las SEQ ID NO: 18, 21 y 25, las SEQ ID NO: 18, 21 y 28, las SEQ ID NO: 18, 21 y 29, las SEQ ID NO: 18, 21 y 30, las SEQ ID NO: 18, 21 y 23, las SEQ ID NO: 19, 21 y 23, las SEQ ID NO: 20, 21 y 23, las SEQ ID NO: 18, 21 y 24, o las SEQ ID NO: 18, 21 y 25, respectivamente. La divulgación también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VH de anticuerpo, en el que la VH comprende secuencias de aminoácidosecuencias de aminoácidos de VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 idénticas a, o idénticas excepto por cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos en una o más de las VH-CDR a: las SEQ ID NO: 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 31, 33 y 35, o las SEQ ID NO: 31, 34 y 35, respectivamente.

Además, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VL y una VH que comprenden secuencias de aminoácidosecuencias de aminoácidos de VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 idénticas o idénticas excepto por cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos en una o más CDR a: las SEQ ID NO: 18, 21, 22, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 26, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 27, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 20, 21, 22, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 19, 21, 22, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 25, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 28, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 29, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 30, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21,

23, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 19, 21, 23, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 20, 21, 23, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 24, 31, 32 y 35, o las SEQ ID NO: 18, 21, 25, 31, 32 y 35, respectivamente. Además, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VL de anticuerpo y una VH de anticuerpo, en el que la VL comprende una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos idéntica en al menos de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 100% a una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17. La divulgación también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3 que comprende una VL de anticuerpo y una VH de anticuerpo, en el que la VH comprende una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos idéntica en al menos de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 100% a una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13. Además, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a HER3, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una VL que comprende una secuencia idéntica en al menos de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 100% a una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, y en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una VH que comprende una secuencia idéntica en al menos de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 100% a una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

La divulgación también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado, que comprende una VL que comprende SEQ ID NO: 49 y una VH que comprende SEQ ID NO: 50. Además, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado, que comprende una VL que comprende SEQ ID NO: 3 y una VH que comprende SEQ ID NO: 2. Además, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a un epítopo dentro del dominio extracelular de HER3, que comprende una VL de anticuerpo de SEQ ID NO:3, una VH de anticuerpo de SEQ ID NO: 2 y una región constante de IgG1 de SEQ ID 46. Además, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aislado que se une específicamente a un epítopo dentro del dominio extracelular de HER3, que consiste en una VL de anticuerpo de SEQ ID NO: 3, una VH de anticuerpo de SEQ ID NO: 2 y una región constante de IgG1 de SEQ ID 46.

Breve descripción de los dibujos/figuras

La figura 1 muestra la internalización de anticuerpos monoclonales anti-HER3 del clon 16 en células KPL4, mostrada como la depleción de la tinción fluorescente superficial. El panel superior muestra la internalización a tiempo = 0. Los paneles inferiores muestran la internalización después de 2,5 horas.

La figura 2A muestra una alineación múltiple de secuencias que corresponde a las secuencias de VL del clon 16 de anticuerpos monoclonales anti-HER3 (CL16; original, clon progenitor), clon 16 (GL; clon de línea germinal determinada), 5H6, 8A3, 4H6, 6E.3, 2B11, 2D1, 3A6 y 4C4. Se indica el emplazamiento de CDR1, CDR2 y CDR3. Se resaltan los residuos de aminoácido que difieren con respecto al anticuerpo de CL16de CL16 (GL).

La figura 2B muestra una alineación múltiple de secuencias que corresponde a las secuencias de VH del clon 16 de anticuerpos monoclonales anti-HER3 (CL16; clon progenitor), y clones 15D12.1 (también denominados 15D12.I) y 15D12.2 (también denominados 15D12.V). Se indican los emplazamientos de CDR1, CDR2 y CDR3. Se resaltan los residuos de aminoácido que difieren con respecto al anticuerpo progenitor de CL16de CL16.

La figura 2C muestra una alineación múltiple de secuencias que corresponde a las secuencias de VL de CL16de CL16 de anticuerpos monoclonales anti-HER3 (original, clon progenitor), CL16 (GL; clon de línea germinal determinada), 1A4, 2C2, 3E.1, 2F10 y 2B11. Se indica el emplazamiento de CDR1, CDR2 y CDR3. Se resaltan los residuos de aminoácido que difieren con respecto al anticuerpo de CL16de CL16 (GL).

La figura 3 muestra la supresión de la fosforilación de HER3 (pHER3) en células MCF-7 dirigidas por ligandos, en la que sólo se activa HER3 por HRG exógena (ligando). Se analizaron el anticuerpo monoclonal anti-HER3 2C2de 2C2, los anticuerpos monoclonales anti-HER3 AMG y MM publicados, y el anticuerpo de control R347. Se presentan los porcentajes máximos de inhibición de pHER3 y las CI_{50}.

La figura 4 muestra la supresión del crecimiento en células MDA-MB-175, un modelo dirigido de bucle autocrino de HRG establecido en el que la HRG endógena dirige la actividad de HER3 y el crecimiento celular. Se analizaron el anticuerpo monoclonal anti-HER3 2C2de 2C2, los anticuerpos monoclonales anti-HER3 AMG y MM publicados, y el anticuerpo de control R347. Se presentaron los porcentajes máximos de la inhibición del crecimiento y las CI_{50}.

La figura 5 muestra la supresión del crecimiento en células HMCB, un modelo dirigido de bucle autocrino de HRG

establecido en el que la HRG endógena dirige la actividad de HER3 y el crecimiento celular. Se analizaron el anticuerpo monoclonal anti-HER3 2C2de 2C2, los anticuerpos monoclonales anti-HER3 AMG y MM publicados, y el anticuerpo de control R347. Se presentan las CI_{50}.

La figura 6 muestra que el 2C2 no sólo inhibió el crecimiento celular de HMCB sino que también suprimió la fosforilación de HER3 (pHER3) y la fosforilación de AKT (pAKT) en este melanoma dependiente de ligando.

La figura 7 muestra que el 2C2 suprimió la fosforilación de HER3 (pHER3) y la fosforilación de AKT (pAKT) en el NSCLC A549 dependiente de ligando.

La figura 8 muestra la supresión de fosforilación de HER3 (pHER3) en modelos celulares para cáncer de pulmón, gástrico y de mama. El panel A muestra la supresión de pHER3 en la línea celular HCC827, un modelo de NSCLC dirigido por EGFR mutante con interferencia de EGFR/HER3. El panel B muestra la supresión de pHER3 en un modelo de NSCLC HCC827 resistente a EGFR TKI obtenido a través de un tratamiento de larga duración con EGFR TKI. El panel C muestra la supresión de pHER3 en la línea celular MKN45, un modelo de cáncer gástrico amplificado por cMET con interferencia de cMET-HER3. El panel D muestra la supresión de pHER3 en la línea celular Kato III, un modelo de cáncer gástrico amplificado por FGFR2 con interferencia de FGFR2-HER3. El panel E muestra la supresión de pHER3 en la línea celular BT-474, un modelo independiente de ligando de cáncer de mama amplificado por HER2 (es decir, las células carecen de expresión de HRG). Se analizaron el anticuerpo monoclonal anti-HER3 2C2, los anticuerpos monoclonales anti-HER3 AMG y MM publicados, y el anticuerpo de control R347. Se presentan los porcentajes máximos de inhibición de pHER3 y las CI_{50}.

La figura 9 muestra la supresión de fosforilación de AKT (pAKT) en modelos celulares para cáncer gástrico y de mama. El panel A muestra la supresión de pAKT en la línea celular MKN45. El panel B muestra la supresión de pAKT en la línea celular Kato III. El panel C muestra la supresión de pAKT en la línea celular BT-474, un modelo independiente de ligando de cáncer de mama amplificado por HER2 (es decir, las células carecen de expresión de HRG). Se analizaron el anticuerpo monoclonal anti-HER3 2C2, los anticuerpos monoclonales anti-HER3 AMG y MM publicados, y el anticuerpo de control R347. Se presentan los porcentajes máximos de inhibición de pAKT y las CI_{50}.

La figura 10 muestra que el 2C2 suprime la señalización y proliferación celular en células MDA-MB-361. El panel A muestra que 2C2 suprimió la fosforilación de HER3 (pHER3) en células MDA-MB-361 amplificadas por HER2. El panel B muestra que 2C2 suprimió el crecimiento celular de una manera dependiente de la dosis. El porcentaje de inhibición se muestra para los tratamientos de 6 y 14 días (paneles superiores e inferiores, respectivamente).

La figura 11 muestra que el 2C2 suprimió la fosforilación de HER3 (pHER3) en células HARA-B que expresan altos niveles de HRG.

La figura 12 muestra que el 2C2 y el rhuMab 2C4, pero no los antagonistas de EGFR cetuximab o gefitinib, inhiben la señalización dependiente de ligando HRG (parte inferior de los paneles A y B). La parte superior de los paneles A y B son células basales, SW620 (panel A, izquierda), SW480 (panel A, centro), Colo205 (panel A, derecha), LOVO (panel B, izquierda), HCT15 (panel B, centro) y Caco-2 (panel B, derecha).

La figura 13 muestra un ensayo de unión de ELISA de HRG-HER3 que mide el bloqueo directo de HRG que se une a HER3 por el clon 16, anticuerpos monoclonales anti-HER3 AMG y MM publicados, un anticuerpo anti-HER3 monoclonal bloqueante de ligandos de control positivo y el anticuerpo de control R347.

La figura 14 muestra que el 2C2 bloquea la dimerización de HER2-HER3. El panel A muestra un ensayo de dimerización de HER2-HER3 inducible por HRG que evalúa la extensión de la formación del complejo HER2-HER3 en células T-47D, un modelo dependiente de ligando que muestra una clara asociación de HER2-HER3 inducida por HRG, tratada previamente con 2C2, CL16, anticuerpos monoclonales anti-HER3 AMG y MM. Todos los anticuerpos anti-HER3 bloquearon esta dimerización de HER2-HER3 inducida por ligando. El panel B muestra un ensayo de dimerización de HER2-HER3 independiente de ligando que evalúa que la extensión de formación del complejo HER2-HER3 en células BT-474, tratadas previamente con 2C2 o CL16 bloqueó esta dimerización de HER2-HER3 independiente de ligando.

La figura 15 muestra la internalización y degradación de HER3 inducida por 2C2. El panel A muestra un ensayo de internalización basado en FACS que cuantifica la evolución temporal y la extensión de la internalización diana en respuesta a dos concentraciones diferentes de anticuerpo monoclonal de 2C2. El panel B muestra la degradación de HER3 en células cancerosas colorrectales modelo Lovo, HCT15 y SW620 tratadas previamente con anticuerpo monoclonal anti-HER3 2C2 o el anticuerpo de control R347.

La figura 16 muestra un análisis del ciclo celular basado en FACS que demuestra que en las células SkBR3, una línea celular de cáncer de mama amplificada por HER2 similar a BT-474, tanto Herceptin® (trastuzumab) como el anticuerpo monoclonal de CL16de CL16 (el parental conduce al anticuerpo monoclonal de 2C2) produjeron la detención del ciclo celular en la fase G1. También se muestran los resultados que corresponden a células tratadas con el anticuerpo de control R347 y con el anticuerpo monoclonal anti-HER2 del rhuMAb 2C4 (pertuzumab/

Omnitarg®).

La figura 17 muestra la inhibición de HRG inducida por la secreción de VEGF por anticuerpos anti-HER3. El panel A muestra los cambios en la secreción de VEGF en células de cáncer de mama BT-474 tratadas previamente con anticuerpos monoclonales anti-HER3, CL16 y Merrimack MM, anticuerpo monoclonal anti-HER2 Herceptin® (trastuzumab) o el anticuerpo de control R347. El panel B muestra los cambios en la secreción de VEGF en células de cáncer de mama modelo MCF-7 tratadas previamente con anticuerpos monoclonales anti-HER3, CL16 y Merrimack MM, anticuerpo monoclonal anti-HER2 Herceptin® (trastuzumab) o el anticuerpo de control R347.

La figura 18 muestra que el anticuerpo monoclonal anti-HER3 2C2 se une a HER3 de macaco cangrejero basado en la superficie celular expresado de manera ectópica en células Ad293 y modula su actividad. El panel A muestra un análisis de inmunotransferencia de tipo Western de células Ad293 transfectadas con un vector de control (lado izquierdo) o un vector que expresa HER3 de macaco cangrejero (lado derecho). Las células se trataron con 2C2 o un anticuerpo de control (R347) con o sin coestimulación con HRG, y se probaron con anticuerpos anti-HER3 (inmunotransferencia del centro), anti-pHER3 (inmunotransferencia superior) y anti-GAPDH (inmunotransferencia inferior). El panel B representa la cuantificación basada en densitometría de pHER3 en los cuatro carriles superiores del panel A.

La figura 19 muestra una reducción dependiente de la dosis en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal de 2C2 usando el modelo de xenoinjerto FADU de cáncer de cabeza y cuello humano. El panel A muestra que 7 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue eficaz de manera máxima al 99% de la dTGI (inhibición del crecimiento del tumor) en este modelo. El panel B muestra una fuerte reducción en el volumen del tumor después de la administración combinada del anticuerpo monoclonal de 2C2 con el anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab usando el modelo de xenoinjerto FADU de cáncer de cabeza y cuello humano. El tratamiento de combinación produjo 7 de cada 10 regresiones parciales y 2/10 regresiones completas.

La figura 20 muestra una farmacocinética no lineal para 2C2 después de la administración de dosis única y de dosis repetida de 5 mg/kg o 30 mg/kg a ratones que portan tumores. Los datos sugieren que el HER3 de ratón sirve como un sumidero para unir el 2C2 administrado a los ratones y que 30 mg/kg como dosis única es suficiente para saturar el sumidero.

La figura 21 muestra el beneficio antitumoral de 10 mg/kg de dosis de carga del anticuerpo monoclonal 2C2 usando el modelo de xenoinjerto FADU de cáncer de cabeza y cuello humano. La administración de una dosis de carga de 2C2 para saturar el sumidero de HER3 de ratón permitió que el 2C2 a 3 mg/kg demostrara una fuerte actividad antitumoral mientras que 3 mg/kg de 2C2 sin una dosis de carga sólo tiene una actividad moderada.

La figura 22 muestra que el tratamiento con 2C2-YTE reduce los niveles de pHER3 y pAKT en extractos de tumores de xenoinjerto FADU. En este experimento, los niveles de pHER3 y pAKT se redujeron en el 59,5% y el 51,7%, respectivamente. No se observó cambio en los niveles totales de HER3 en este experimento.

La figura 23 muestra una reducción dependiente de la dosis en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal de 2C2 usando el modelo de xenoinjerto Detroit562 de cáncer de cabeza y cuello humano. El panel A muestra que 10 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue eficaz de manera máxima al 72% de la dTGI. El panel B muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración combinada del anticuerpo monoclonal de 2C2 con el anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab usando el modelo de xenoinjerto Detroit562 de cáncer de cabeza y cuello humano. El tratamiento de combinación produjo 9 de cada 10 regresiones parciales mientras que solo cetuximab produjo 5/10 regresiones parciales. El modelo de xenoinjerto Detroit562 contiene una mutación de PIK3CA.

La figura 24 muestra una reducción dependiente de la dosis en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal de 2C2-YTE usando el modelo de xenoinjerto CAL27 de cáncer de cabeza y cuello humano.

La figura 25 muestra una reducción dependiente de la dosis en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal de 2C2 usando el modelo de xenoinjerto de NSCLC A549 humano. El panel A muestra que 30 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue eficaz de manera máxima al 91% de la dTGI hasta el último día de la fase de tratamiento (día 33; crecimiento posterior después de eso). 2C2-YTE y 2C2, ambos a 10 mg/kg, tienen una actividad comparable. El panel B muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración combinada del anticuerpo monoclonal de 2C2 con el anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab usando el modelo de xenoinjerto de NSCLC A549 humano. La adición de cetuximab a 2C2 aumentó la actividad de 2C2 durante la fase de tratamiento y retrasó el crecimiento posterior del tumor durante la fase de crecimiento posterior del tumor. El modelo de xenoinjerto de A549 contiene una mutación de KRAS y una deleción de LKB-1.

La figura 26 muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal de 2C2-YTE usando el modelo de xenoinjerto HARA-B de carcinoma de células escamosas humano. 30 mg/kg de 2C2-YTE administrado dos veces por semana fue eficaz de manera máxima al 64,6% de la dTGI. 2C2-YTE a

10 mg/kg tenía una actividad comparable mientras que 2C2-YTE a 3 mg/kg no era activo.

La figura 27 muestra una reducción dependiente de la dosis en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal de 2C2 usando el modelo de xenoinjerto HT-29 de cáncer colorrectal humano. 30 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue eficaz de manera máxima al 56% de la dTGI hasta el último día de la fase de tratamiento (día 26; crecimiento posterior después de eso). 2C2-YTE y 2C2, ambos a 30 mg/kg, tienen actividad comparable. El modelo de xenoinjerto HT-29 contiene una mutación de BRAF.

La figura 28 muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal de 2C2 usando el modelo de xenoinjerto HCT-116 de cáncer colorrectal humano. 30 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue eficaz de manera máxima al 43% de la dTGI. 2C2-YTE y 2C2, ambos a 10 mg/kg, tienen actividad comparable. El modelo de xenoinjerto HCT-116 contiene una mutación de KRAS.

La figura 29 muestra una reducción en volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal de 2C2 usando el modelo de xenoinjerto LOVO de cáncer colorrectal humano. 30 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue eficaz de manera máxima al 48% de la dTGI. 2C2-YTE y 2C2, ambos a 10 mg/kg, tienen actividad comparable. El modelo de xenoinjerto LOVO contiene una mutación de KRAS.

La figura 30 muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal de 2C2 usando el modelo de xenoinjerto DU145 de cáncer de próstata humano. 30 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue eficaz de manera máxima al 77% de la dTGI. El modelo de xenoinjerto DU145 contiene una deleción de LKB-1.

La figura 31 muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal de 2C2 usando el modelo de xenoinjerto ortotópico BT-474 de cáncer de mama humano. El panel A muestra que 30 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue eficaz de manera máxima al 55% de la dTGI. El panel B muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración combinada del anticuerpo monoclonal de 2C2 con el fármaco de molécula pequeña lapatinib usando el modelo de xenoinjerto ortotópico BT-474 de cáncer de mama humano. La adición de 2C2 a lapatinib aumentó la actividad de lapatinib durante la fase de tratamiento y retrasó de manera moderada el recrecimiento del tumor durante la fase de recrecimiento del tumor. 2C2-YTE y 2C2, ambos a 30 mg/kg, tienen actividad comparable durante la fase de tratamiento como tratamientos de monoeficacia. El panel C muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal de 2C2 usando el modelo de xenoinjerto ortotópico BT-474 de cáncer de mama humano. El trastuzumab sólo fue muy activo en este modelo y se observó un pequeño aumento mediante la adición de 2C2 en este modelo. El modelo de xenoinjerto BT-474 contiene HER2 amplificado (3+ mediante HercepTest).

La figura 32 muestra que el tratamiento con el clon 16 (precursor de 2C2) reduce los niveles de pHER3 y pAKT en extractos de tumores de xenoinjerto BT-474. En este experimento, los niveles de pHER3 y pAKT se redujeron al 50% y al 46,1%, respectivamente. No se observó cambio en los niveles totales de HER3 en este experimento.

La figura 33 muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal de 2C2 usando el modelo de xenoinjerto ortotópico MCF-7 de cáncer de mama humano. El panel A muestra que 10 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue eficaz de manera máxima al 34% de la dTGI. 2C2-YTE y 2C2, ambos a 10 mg/kg, tienen actividad comparable. El panel B muestra una reducción en volumen del tumor después de la administración combinada del anticuerpo monoclonal de 2C2 con el fármaco de molécula pequeña paclitaxel usando el modelo de xenoinjerto ortotópico MCF-7 de cáncer de mama humano. La adición de 2C2 a paclitaxel aumentó la actividad de paclitaxel durante la fase de tratamiento. El modelo de xenoinjerto MCF-7 contiene niveles bajos de HER2 (1+ mediante HercepTest).

La figura 34 muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración de 2C2-YTE usando el modelo de xenoinjerto ortotópico MDA-MB-361 de cáncer de mama humano (paneles A-C). La adición de 2C2-YTE al anticuerpo monoclonal trastuzumab aumentó la actividad de trastuzumab durante la fase de tratamiento y retrasó el recrecimiento del tumor durante la fase de recrecimiento del tumor (panel A). La adición de 2C2-YTE al anticuerpo monoclonal rhuMAb 2C4 aumentó de manera moderada la actividad de rhuMAb 2C4, pero no retrasó el recrecimiento de los tumores (panel B). La adición de 2C2-YTE al fármaco de molécula pequeña lapatinib aumentó la actividad de lapatinib, pero no retrasó el recrecimiento de los tumores (panel C).

La figura 35 muestra los niveles de exposición prolongada de 2C2-YTE del anticuerpo monoclonal en suero de ratones transgénicos no sometidos previamente a experimentación con FcRn humano en comparación con 2C2 y el clon 16-GL después de una dosis única de estos anticuerpos a 60 mg/kg.

La figura 36 muestra el aumento en los niveles de proteína de HER3 en respuesta al tratamiento con el inhibidor de MEK (MEKi) selumetinib (indicado mediante una estrella). El tratamiento con MEKi en combinación con 2C2 reduce los niveles de HER3 de nuevo a la normalidad en modelos de cáncer de células HT-29 (izquierda), LOVO (centro) y Colo205 (derecha). También se examinaron los niveles de pHER3 en los modelos HT-29 y LOVO, y mostraron que respondían de manera similar.

La figura 37 muestra que la combinación de 2C2-YTE y selumetinib aumenta la eficacia antitumoral de o bien el agente solo en modelos de xenoinjerto de cáncer subcutáneos y A549 (panel A, parte superior), HT-29 (panel B, parte superior), LOVO (panel C, parte superior). El análisis de inmunotransferencia de tipo Western a partir de lisados de tumores (modelos de xenoinjerto A549, HT-29 y LOVO) de ratones tratados con la combinación mostró que fosfo-HER3 y fosfo-ERK se inhibieron completamente (paneles A-C, parte inferior).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona moléculas y fragmentos de unión a antígeno de las mismas que se unen a HER3. En algunos aspectos, tales moléculas son anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a HER3. Además se proporcionan polinucleótidos relacionados, composiciones que comprenden los anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos y métodos de obtención de los anticuerpos anti-HER3 y fragmentos de unión a antígeno. Se proporcionan adicionalmente los anticuerpos anti-HER3 novedosos para su uso como un medicamento, tal como para tratar cáncer en un sujeto y para usos diagnósticos.

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, primero se definen determinados términos. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

I. Definiciones

Antes de describir la presente invención en detalle, se entenderá que esta invención no se limita a las composiciones o etapas del procedimiento específicas, ya que tales pueden variar. Tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un/uno”, “una” y “el/la” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Los términos “un/uno” (o “una”), así como los términos “uno o más”, y “al menos uno” pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento.

Además, “y/o” cuando se usan en el presente documento se tomarán como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por tanto, el término y/o” tal como se usa en una expresión tal como “A y/o B” en el presente documento se pretende que incluya “A y B”, “A o B”, “A” (solo) y “B” (solo). De manera similar, el término “y/o” tal como se usa en una expresión tal como “A, B y/o C” se pretende que abarque cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica al que se refiere esta divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2ª ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3ª ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos usados en esta invención.

Las unidades, los prefijos y los símbolos se indican en su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidosecuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxilo. Los encabezamientos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos, que pueden tenerse como referencia para la memoria descriptiva en su totalidad. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen de manera más completa como referencia para la memoria descriptiva en su totalidad.

Se entiende que siempre que se describan aspectos en el presente documento con la expresión “que comprende”, también se proporcionan por otra parte aspectos análogos descritos en cuanto a “que consiste en” y/o “que consiste esencialmente en”.

Los aminoácidos se denominan en el presente documento o bien por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, de manera similar, se denominan por sus códigos de una única letra comúnmente aceptados.

Los términos “HER3” y “receptor de HER3” se usan de manera intercambiable en el presente documento, y se refieren a la proteína ErbB3 (también denominada HER3, receptor de ErbB3 en la bibliografía) tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.480.968 y en Plowman *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 87, 4905-4909; véase también, Kani *et al.* (2005) Biochemistry 44, 15842-15857, y Cho y Leahy (2002) Science 297, 1330-1333. La secuencia de proteína HER3 madura de longitud completa (sin secuencia líder) corresponde a la secuencia mostrada en la figura 4 y SEQ ID NO: 4 de la patente estadounidense n.º 5.480.968 menos la secuencia líder de 19 aminoácidos que se escinde de la proteína madura.

Los términos “inhibición” y “supresión” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a cualquier disminución estadísticamente significativa en la actividad biológica, incluyendo el bloqueo completo de la actividad. Por ejemplo, “inhibición” puede referirse a una disminución de aproximadamente el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 100% en la actividad biológica. Por consiguiente, cuando los términos “inhibición” o “supresión” se aplican para describir, por ejemplo, un efecto sobre la fosforilación de HER3 mediada por ligando, el término se refiere a la capacidad de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para disminuir de manera estadísticamente significativa la fosforilación de HER3 inducida por un ligando similar a EGF, en relación con la fosforilación de una célula no tratada (control). La célula que expresa HER3 puede ser una célula o línea celular que se produce de manera natural (por ejemplo, una célula cancerosa) o puede producirse de manera recombinante introduciendo un ácido nucleico que codifica para HER3 en una célula huésped. En un aspecto, la molécula de unión anti-HER3, es decir, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, inhibe la fosforilación de HER3 mediada por ligando en al menos el 10%, o al menos el 20%, o al menos el 30%, o al menos el 40%, o al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90%, o aproximadamente el 100%, tal como se determina, por ejemplo, mediante inmunotransferencia de tipo Western seguida de sondeo con un anticuerpo anti-fosfotirosina o mediante ELISA, tal como se describe en los ejemplos a continuación.

El término “supresión del crecimiento” de una célula que expresa HER3, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de la molécula de unión anti-HER3, es decir, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, para disminuir de manera estadísticamente significativa la proliferación de una célula que expresa HER3 en relación con la proliferación en ausencia del anticuerpo anti-HER3, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En un aspecto, la proliferación de una célula que expresa HER3 (por ejemplo, una célula cancerosa) puede disminuirse en al menos el 10%, o al menos el 20%, o al menos el 30%, o al menos el 40%, o al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90%, o aproximadamente el 100% cuando se ponen en contacto células con una molécula de unión anti-HER3, es decir, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, en relación con la proliferación medida en ausencia de la molécula de unión anti-HER3, es decir, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (condiciones de control). La proliferación celular puede analizarse usando técnicas reconocidas en la técnica con tasa de medición de la división celular, la fracción de células dentro de una población celular que experimenta división celular y/o la tasa de pérdida celular de una población celular debido a la diferenciación terminal o muerte celular (por ejemplo, incorporación de timidina).

Los términos “anticuerpo” o “inmunoglobulina”, tal como se usan de manera intercambiable en el presente documento, incluyen anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno o cadenas sencillas de los mismos.

Un anticuerpo típico comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que se conservan más, denominadas regiones de entramado (FW). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FW, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores huéspedes, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema complementario clásico. Los anticuerpos a modo de ejemplo de la presente incluyen los anticuerpos anti-HER3 (original y de línea germinal determinada) del clon 16 (CL16), clones optimizados por afinidad incluyendo por ejemplo, el anticuerpo anti-HER3 2C2, y anticuerpos anti-HER3 optimizados por semivida del suero incluyendo por ejemplo el anticuerpo anti-HER3 2C2-YTE.

El término “determinación de línea germinal (germlining)” significa que los aminoácidos en posiciones específicas en un anticuerpo vuelven a mutarse a los de la línea germinal. Por ejemplo, el anticuerpo de CL16de CL16 “de línea germinal determinada (germlined)” se genera a partir del anticuerpo de CL16de CL16 original introduciendo tres mutaciones puntuales, Y2S, E3V y M20I, en la FW1 de las regiones VL.

El término “anticuerpo” significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, un polipéptido, un péptido, un hidrato de carbono, un polinucleótido, un lípido o combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (tales como fragmentos de Fab, Fab’, F(ab’)2 y Fv), mutantes de Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales

como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación de antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno siempre que los anticuerpos exhiban la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basándose en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienes estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas. Los anticuerpos pueden ser desnudos o conjugados a otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc.

Un anticuerpo “bloqueante” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une, tal como HER3. En un determinado aspecto, los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben de manera sustancial o completa la actividad biológica del antígeno. De manera deseable, la actividad biológica se reduce en el 10%, el 20%, el 30%, el 50%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, o incluso el 100%.

El término “anticuerpo HER3” o “un anticuerpo que se une a HER3” o “anti-HER3” se refiere a un anticuerpo que puede unirse a HER3 con la suficiente afinidad de manera que el anticuerpo sea útil como agente terapéutico o reactivo de diagnóstico en la selección como diana de HER3. La extensión de la unión de un anticuerpo anti-HER3 a una proteína no HER3 no relacionada es menor de aproximadamente el 10% de la unión del anticuerpo a HER3 tal como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA), BIACORE™ (usando HER3 recombinante como analito y el anticuerpo como ligando, o viceversa), u otros ensayos de unión conocidos en la técnica. En determinados aspectos, un anticuerpo que se une a HER3 tiene una constante de disociación (K_D) de ≤1 μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤1 nM, ≤0,1 nM, ≤10 pM, ≤1 pM o ≤0,1 pM.

El término “fragmento de unión a antígeno” se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Se conoce en la técnica que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de Fab, Fab’, F(ab’)2 y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un “anticuerpo monoclonal” se refiere a una población de anticuerpos homogénea implicada en el reconocimiento y la unión altamente específicos de un único determinante antigénico o epítopo. Es decir, al contrario que los anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término “anticuerpo monoclonal” abarca anticuerpos monoclonales tanto intactos como de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpo (tales como Fab, Fab’, F(ab’)2, Fv), mutantes de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, “anticuerpo monoclonal” se refiere a tales anticuerpos obtenidos por cualquier número de vías incluyendo, pero sin limitarse a, mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

El término “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo derivado de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, murina), que se ha modificado por ingeniería para contener secuencias mínimas no humanas (por ejemplo, murina). Normalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de la región determinante complementaria (CDR) se reemplazan por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo o hámster) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones *et al.*, 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science, 239:1534-1536). En algunos casos, los residuos de la región de entramado Fv (FW) de una inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

El anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de residuos adicionales o bien en la región de entramado Fv y/o bien dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana siempre que todas o sustancialmente todas las regiones FR sean las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de un dominio o una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en las patentes estadounidenses n.os 5.225.539 o 5.639.641.

Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera de anticuerpo o la región variable de la cadena pesada de anticuerpo, o bien sola o bien en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones de entramado (FW) conectadas por las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada

cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FW y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencias de especies cruzadas (es decir, Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Betesda Md.)); y (2) un enfoque basado en los estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani *et al.* (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). Además, las combinaciones de estos dos enfoques se usan algunas veces en la técnica para determinar las CDR.

El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se refiere a un residuo en el dominio variable (aproximadamente residuos 1-107 de la cadena ligera y residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Betesda, Md. (1991)).

La numeración de posiciones de aminoácidos como en Kabat, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Betesda, Md. (1991). Usando este sistema de numeración, la secuencia lineal real de aminoácidos puede contener menos o más aminoácidos que corresponden a un acortamiento de, o una inserción en, una FW o una CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácidos (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del residuo 82 de la FW de cadena pesada.

Tabla 1

Bucle	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
		(Numeración de Kabat)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Numeración de Chothia)	
H2	H50-H65	H50-H58	H32-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

La numeración de Kabat de residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante la alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat “habitual”. En cambio, Chothia se refiere al emplazamiento de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). El extremo del bucle de CDR-H1 de Chothia cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto es debido a que el esquema de numeración de Kabat sitúa las inserciones en H35A y H35B; si no están presentes ni 35A ni 35B, el bucle finaliza en 32; si sólo está presente 35A, el bucle finaliza en 33; si están presentes ambos 35A y 35B, el bucle finaliza en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan mediante un software de modelado de anticuerpos de AbM de Oxford Molecular.

IMGT (ImMunoGeneTics) también proporciona un sistema de numeración para las regiones variables de inmunoglobulina, incluyendo las CDR. Véase, por ejemplo, Lefranc, M.P. *et al.*, Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77(2003). El sistema de numeración de IMGT se basó en una alineación de más de 5.000 secuencias, datos estructurales y caracterización de bucles hipervariables, y permite una fácil comparación de las regiones variables y CDR para todas las especies. Según el esquema de numeración de IMGT, VH-CDR1 está en las posiciones 26 a 35, VH-CDR2 está en las posiciones 51 a 57, VH-CDR3 está en las posiciones 93 a 102, VL-CDR1 está en las posiciones 27 a 32, VL-CDR2 está en las posiciones 50 a 52 y VL-CDR3 está en las posiciones 89 a 97.

Tal como se usan a lo largo de la memoria descriptiva, las secuencias de las VH-CDR descritas corresponden a los emplazamientos clásicos de la numeración de Kabat, concretamente VH-CDR1 de Kabat está en las posiciones 31-35, VH-CDR2 está en las posiciones 50-65 y VH-CDR3 está en las posiciones 95-102. VL-CDR2 y VL-CDR3 también corresponden a los emplazamientos clásicos de la numeración de Kabat, concretamente a las posiciones 50-56 y 89-97, respectivamente. Tal como se usan en el presente documento, los términos “VL-CDR1” o “CDR1 de cadena ligera” corresponden a secuencias localizadas en las posiciones de Kabat 23-34 en la VL (en cambio, el emplazamiento clásico de VL-CDR1 según el esquema de la numeración de Kabat corresponde a las posiciones 24-

34).

Tal como se usa en el presente documento, la región Fc incluye los polipéptidos que comprenden la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer domino de inmunoglobulina de región constante. Por tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y el extremo N-terminal bisagra flexible a estos dominios. Para IgA y IgM, la Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, la Fc comprende dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 ($C\gamma\gamma2$ y $C\gamma\gamma3$) y la bisagra entre Cgamma1 ($C\gamma\gamma1$) y Cgamma2 ($C\gamma\gamma2$). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para comprender los residuos C226 o P230 hasta su extremo carboxi-terminal, en la que la numeración es según el índice EU tal como se expone en Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Betesda, Md. (1991)). La Fc puede referirse a esta región de manera aislada, o a esta región en el contexto de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o una proteína de fusión de Fc. Se han observado polimorfismos en varias posiciones de Fc diferentes, incluyendo, pero sin limitarse a, las posiciones 270, 272, 312, 315, 356 y 358 tal como se numeran mediante el índice EU, y por tanto pueden existir ligeras diferencias entre la secuencia presentada y las secuencias en la técnica anterior.

El término “anticuerpo humano” significa un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos que corresponde a un anticuerpo producido por un ser humano obtenido usando cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada y/o ligera humano tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena pesada humanos y de cadena ligera murinos.

El término “anticuerpos quiméricos” se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Normalmente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otra (normalmente ser humano) para evitar provocar una respuesta inmunitaria en esa especie.

Los términos “YTE” o “mutante de YTE” se refieren a una mutación en la Fc de IgG1 que da como resultado un aumento en la unión a FcRn humano y mejora la semivida sérica del anticuerpo que tiene la mutación. Un mutante de YTE comprende una combinación de tres mutaciones, M252Y/S254T/T256E (numeración EU, Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, EE.UU. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, D.C.), introducidas en la cadena pesada de una IgG1. Véase la patente estadounidense n.º 7.658.921. El mutante de YTE ha demostrado que aumenta la semivida sérica de anticuerpos en aproximadamente cuatro veces en comparación con las versiones de tipo natural del mismo anticuerpo (Dall’Acqua *et al.*, J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006)). Véase también la patente estadounidense n.º 7.083.784.

“Afinidad de unión” se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, “afinidad de unión” se refiere a una afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (K_D). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad se unen generalmente a un antígeno de manera lenta y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen generalmente a un antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conocen en la técnica una variedad de métodos de medición de la afinidad de unión, pudiéndose usar cualquiera de ellos para los propósitos de la presente invención.

La “potencia” se expresa normalmente como un valor de CI_{50}, en nM a menos que se mencione lo contrario. CI_{50} es la mediana de la concentración inhibidora de una molécula de anticuerpo. En ensayos funcionales, CI_{50} es la concentración que reduce una respuesta biológica al 50% de su máximo. En estudios de unión a ligando, CI_{50} es la concentración que reduce la unión del receptor al 50% del nivel de unión específico máximo. La CI_{50} puede calcularse mediante cualquier número de medios conocidos en la técnica. La mejora en la potencia puede determinarse midiendo, por ejemplo, frente al anticuerpo monoclonal de CL16de CL16 (clon 16) progenitor.

La mejora en veces en la potencia para los anticuerpos o polipéptidos de la invención en comparación con un anticuerpo del clon 16 puede ser de al menos aproximadamente 2 veces, de al menos aproximadamente 4 veces, de al menos aproximadamente 6 veces, de al menos aproximadamente 8 veces, de al menos aproximadamente 10 veces, de al menos aproximadamente 20 veces, de al menos aproximadamente 30 veces, de al menos aproximadamente 40 veces, de al menos aproximadamente 50 veces, de al menos aproximadamente 60 veces, de al menos aproximadamente 70 veces, de al menos aproximadamente 80 veces, de al menos aproximadamente 90 veces, de al menos aproximadamente 100 veces, de al menos aproximadamente 110 veces, de al menos

aproximadamente 120 veces, de al menos aproximadamente 130 veces, de al menos aproximadamente 140 veces, de al menos aproximadamente 150 veces, de al menos aproximadamente 160 veces, de al menos aproximadamente 170 veces o de al menos aproximadamente 180 veces o más.

La "citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" o "CCDA" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a los receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite a estas células citotóxicas efectoras unirse específicamente a una célula diana que porta antígeno y posteriormente destruir la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos frente a IgG de alta afinidad específicos dirigidos a la superficie de células diana "arman" las células citotóxicas y se requieren de manera absoluta para dicha destrucción. La lisis de la célula diana es extracelular, requiere contacto directo célula a célula y no implica complemento. Se contempla que, además de los anticuerpos, otras proteínas que comprenden regiones Fc, específicamente proteínas de fusión de Fc, que tienen la capacidad de unirse específicamente a una célula diana que porta antígeno, podrán efectuar la citotoxicidad mediada por células. Por simplicidad, la citotoxicidad mediada por células que resulta de la actividad de una proteína de fusión de Fc también se denomina en el presente documento como actividad de CCDA.

Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, una célula o composición que se "aísla" es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, una célula o composición que está en una forma no encontrada en la naturaleza. Los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, las células o composiciones aislados incluyen aquellos que se han purificado hasta un grado que ya no están en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunos aspectos, un anticuerpo, polinucleótido, vector, una célula o composición que se aísla es sustancialmente puro.

El término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero sin limitarse a, seres humanos, primates no humanos, roedores, y similares, que va a ser el receptor de un tratamiento particular. Normalmente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera intercambiable en el presente documento en referencia a un sujeto humano.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que pueden ser inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administra la composición. Tal composición puede ser estéril.

Una "cantidad eficaz" de un anticuerpo tal como se da a conocer en el presente documento es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente indicado. Una "cantidad eficaz" puede determinarse de manera empírica y de una manera rutinaria, en relación con el propósito indicado.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o un trastorno en un sujeto o mamífero.

La palabra "etiqueta" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o una composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo de manera que genera un anticuerpo "etiquetado". La etiqueta puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, etiquetas de radioisótopos o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o una composición de sustrato que es detectable.

Los términos tales como "que trata" o "tratamiento" o "para tratar" o "que alivia" o "para aliviar" se refieren tanto a (1) medidas terapéuticas que curan, ralentizan, atenúan síntomas de, y/o detienen la progresión de un estado o trastorno patológico diagnosticado como a (2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o ralentizan el desarrollo de un estado o trastorno patológico seleccionado como diana. Por tanto, aquellos que necesitan el tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en los que debe prevenirse el trastorno. En determinados aspectos, un sujeto se "trata" con éxito de cáncer según la presente invención si el paciente muestra, por ejemplo, una remisión total, parcial o transitoria de un determinado tipo de cáncer.

Los términos "cáncer", "tumor", "canceroso" y "maligno" se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, carcinoma incluyendo adenocarcinomas, linfomas, blastomas, melanomas, sarcomas y leucemias. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer de páncreas, glioblastoma, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado tal como carcinoma hepático y hepatoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama mediado de manera hormonal, véase, por ejemplo, Innes *et al.* (2006) Br. J. Cancer 94:1057-1065), cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, mieloma (tal como mieloma múltiple), carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón tal como carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer de esófago, diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello y cánceres de orígenes mucinosos, tales como, cáncer ovárico mucinoso,

colangiocarcinoma (hígado) y carcinoma papilar renal mucinoso.

Tal como se usa en el presente documento, el término “carcinomas” se refiere a cánceres de células epiteliales, que son células que cubren la superficie del cuerpo, producen hormonas y constituyen glándulas. Los ejemplos de carcinomas son cánceres de la piel, el pulmón, el colon, el estómago, la mama, la próstata y la glándula tiroidea.

El término “mutación de KRAS”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a mutaciones encontradas en determinados cánceres en un homólogo humano del oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten v-Ki-ras2. Los ejemplos no limitativos de secuencias de ARNm del gen KRAS humano incluyen los n.os de registro de Genbank NM004985 y NM033360. Se ha informado que las mutaciones de KRAS se encontraron en el 73% de tumores de páncreas, el 35% de tumores colorrectales, el 16% de tumores ováricos y el 17% de tumores de pulmón. La mutación de KRAS se produce generalmente en los codones 12 a 143 del gen KRAS humano.

“Polinucleótido” o “ácido nucleico”, tal como se usan de manera intercambiable en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

El término “vector” significa un constructo, que puede administrar, y en algunos aspectos expresar, uno o más gen(es) o secuencia(s) de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y determinadas células eucariotas, tales como células productoras.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede interrumpirse por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de manera natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado. Se incluyen también dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, ya que los polipéptidos de esta invención se basan en anticuerpos, en determinados aspectos, los polipéptidos pueden producirse como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

Los términos “idéntico” o “identidad” porcentual en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácido que son los mismos, cuando se compara y alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para determinar una correspondencia máxima, sin considerar cualquier sustitución de aminoácidos conservativa como parte de la identidad de secuencia. La identidad porcentual puede medirse usando software o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Se conocen diversos algoritmos y software en la técnica que pueden usarse para obtener alineaciones de aminoácidos o secuencias de nucleótidos.

Un ejemplo no limitativo de un algoritmo de alineación de secuencias es el algoritmo descrito en Karlin *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:2264-2268, tal como se modifica en Karlin *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:5873-5877, y se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul *et al.*, 1991, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402). En determinados aspectos, puede usarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, 1996, Methods in Enzymology, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, San Francisco Sur, California) o Megalign (DNASTAR) son programas de software adicionales disponibles de manera pública que pueden usarse para alinear secuencias. En determinados aspectos, la identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG (por ejemplo, usando una matriz de NWSgapdna.CMP y un peso de huecos de 40, 50, 60, 70 ó 90 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6). En determinados aspectos alternativos, puede usarse el programa GAP en el paquete de software GCG, que incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) para determinar la identidad porcentual entre dos secuencias de aminoácidosecuencias de aminoácidos (por ejemplo, usando o bien una matriz BLOSUM 62 o una matriz PAM250, y un peso de huecos de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5). Alternativamente, en determinados aspectos, la identidad porcentual entre secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidosecuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Myers y Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Por ejemplo, la identidad porcentual puede determinarse usando el programa ALIGN (versión 2.0) y usando una PAM120 con tabla de residuos, una penalización por longitud de huecos de 12 y una penalización de huecos de 4. Los parámetros apropiados para una alineación máxima mediante un software de alineación particular pueden determinarse por un experto en la técnica. En determinados aspectos, se usan los parámetros por defecto del software de alineación.

En determinados aspectos, la identidad en porcentaje “X” de una primera secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos con respecto a una segunda secuencia de aminoácidos se calcula como 100 x (Y/Z), en la que Y es el número de residuos de aminoácido marcados como coincidencias idénticas en la alineación de las secuencias primera y segunda (tal como se alinean mediante inspección visual o un programa de alineación de secuencias particular) y Z es el número total de residuos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera secuencia es más larga que la de la segunda secuencia, la identidad porcentual de la primera secuencia con respecto a la segunda secuencia será mayor que la identidad porcentual de la segunda secuencia con respecto a la primera secuencia.

Una “sustitución de aminoácidos conservativa” es una en la que un residuo de aminoácido se reemplaza por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservativa. En determinados aspectos, las sustituciones conservativas en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos de la invención no anulan la unión del polipéptido o anticuerpo que contiene a la secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos al/a los antígeno(s), es decir, el HER3 al que se une el polipéptido o anticuerpo. Los métodos de identificación de sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell *et al.*, Biochem. 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi *et al.*, Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); y Burks *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 94:412-417 (1997)).

El término “secuencia consenso”, tal como se usa en el presente documento con respecto a regiones variables de cadena ligera (VL) y de cadena pesada (VH), se refiere a una secuencia de VL o VH compuesta o genérica definida basándose en la información sobre qué residuos de aminoácido dentro de la cadena de VL o VH son susceptibles a modificación sin detrimento para la unión a antígeno. Por tanto, en una “secuencia consenso” para una cadena de VL o VH, determinadas posiciones de aminoácidos están ocupadas por uno de los múltiples posibles residuos de aminoácido en esa posición. Por ejemplo, si una arginina (R) o una serina (S) se produce en una posición particular, entonces esa posición particular dentro de la secuencia consenso puede ser o bien arginina o bien serina (R o S). Pueden definirse secuencias consenso para cadena de VH y VL, por ejemplo, mediante maduración por afinidad *in vitro* (por ejemplo, aleatorizando cada posición de aminoácido en una determinada CDR usando cebadores codificantes degenerados), mediante mutagénesis de exploración (por ejemplo, mutagénesis de exploración de alanina) de residuos de aminoácido dentro de las CDR de anticuerpo, o cualquier otro método conocido en la técnica, seguido por la evaluación de la unión de los mutantes al antígeno para determinar si la posición de aminoácido mutada afecta a la unión a antígeno. En algunos aspectos, se introducen mutaciones en las regiones CDR. En otros aspectos, se introducen mutaciones en las regiones de entramado. En algunos otros aspectos, se introducen mutaciones en las CDR y en las regiones de entramado.

II. Moléculas de unión anti-HER3

La presente invención proporciona moléculas de unión a HER3, es decir, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a HER3 que comprenden una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, que comprende una VL que comprende SEQ ID NO: 3 y una VH que comprende SEQ ID NO: 2. Las secuencias de aminoácidosecuencias de aminoácidos (aa) y nucleótidos (nt) de longitud completa para HER3 se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, n.º de registro de UniProt P2186 para HER3 humano, o n.º de registro de UniProt O88458 para HER3 de ratón). En algunos aspectos, las moléculas de unión anti-HER3 son anticuerpos humanos. Las moléculas de unión a HER3 son anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En algunos aspectos, las moléculas de unión a HER3, es decir, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden un Fab, un Fab', un $F(ab')_2$, un Fd, un Fv o scFv de cadena sencilla, un Fv unido a disulfuro, un dominio de V-NAR, una IgNar, un intracuerpo, una IgG ΔCH2, un minicuerpo, un $F(ab')_3$, un tetracuerpo, un triacuerpo, un diacuerpo, un anticuerpo con un solo dominio, DVD-Ig, Fcab, Acm^2, un $(scFv)_2$ o un scFv-Fc. En algunos aspectos, el anticuerpo es del subtipo de IgG1 y comprende el YTE mutante triple, tal como se da a conocer en la sección de definiciones citada anteriormente.

Además se dan a conocer anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se modifican en comparación con el anticuerpo del clon 16 (CL16) progenitor. Las modificaciones pueden incluir mutaciones en las regiones CDR y/o en las regiones FW en comparación con CL16. En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo anti-HER3 dado a conocer en el presente documento comprende modificaciones para CDR1 y/o CDR3 de la cadena ligera de CL16, incluyendo, pero sin limitarse a:

1) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia consenso $X_1GSX_2SNIGLNYVS$, en la que X_1 se selecciona de R o S, y X_2 se selecciona de S o L; y

2) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia consenso AAWDDX$_3$X$_4$X$_5$GEX$_6$, en la que X$_3$ se selecciona de S o G, X$_4$ se selecciona de L o P, X$_5$ se selecciona de R, I, P o S, y X$_6$ se selecciona de V o A.

En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención comprende modificaciones para la CDR2 de la cadena pesada de CL16, incluyendo, pero sin limitarse a, una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia consenso X$_7$IGSSGGVTNYADSVKG, en la que X$_7$ se selecciona de Y, I o V.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región VL que comprende la secuencia consenso de aminoácidos:

[FW$_1$]X$_1$GSX$_2$SNIGLNYVS[FW$_2$]RNNQRPS[FW$_3$]AAWDDX$_3$X$_4$X$_5$GEX$_6$[FW$_4$]

en la que [FW$_1$], [FW$_2$], [FW$_3$] y [FW$_4$] representan los residuos de aminoácido de la región 1 de entramado de VL (SEQ ID NO: 40 ó 44), la región 2 de entramado de VL (SEQ ID NO: 41), la región 3 de entramado de VL (SEQ ID NO: 42) y la región 4 de entramado de VL (SEQ ID NO: 43), y en la que X$_1$ representa residuos de aminoácido arginina (R) o serina (S), X$_2$ representa residuos de aminoácido serina (S) o leucina (L), X$_3$ representa residuos de aminoácido serina (S) o ácido glutámico (E), X$_4$ representa residuos de aminoácido leucina (L) o prolina (P), X$_5$ representa residuos de aminoácido arginina (R), isoleucina (I), prolina (P) o serina (S), y X$_6$ representa residuos de aminoácido valina (V) o arginina (R).

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región VH que comprende la secuencia consenso de aminoácidos:

[FW$_5$]YYYMQ[FW$_6$]X$_7$IGSSGGVTNYADSVKG[FW$_7$]VGLGDAFDI[FW$_8$]

en la que [FW$_5$], [FW$_6$], [FW$_7$] y [FW$_8$] representan los residuos de aminoácido de la región 1 de entramado de VH (SEQ ID NO: 36), la región 2 de entramado de VH (SEQ ID NO: 37), la región 3 de entramado de VH (SEQ ID NO: 38) y región 4 de entramado de VH (SEQ ID NO: 39), y en la que X$_7$ representa residuos de aminoácido tirosina (Y), isoleucina (I) o valina (V).

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región VL que comprende la secuencia consenso de aminoácidos:

[FW$_1$]X$_1$GSX$_2$SNIGLNYVS[FW$_2$]RNNQRPS[FW$_3$]AAWDDX$_3$X$_4$X$_5$GEX$_6$[FW$_4$]

en la que [FW$_1$], [FW$_2$], [FW$_3$] y [FW$_4$] representan los residuos de aminoácido de la región 1 de entramado de VL (SEQ ID NO: 40 ó 44), la región 2 de entramado de VL (SEQ ID NO: 41), la región 3 de entramado de VL (SEQ ID NO: 42) y la región 4 de entramado de VL (SEQ ID NO: 43), y en la que X$_1$ representa residuos de aminoácido arginina (R) o serina (S), X$_2$ representa residuos de aminoácido serina (S) o leucina (L), X$_3$ representa residuos de aminoácido serina (S) o ácido glutámico (E), X$_4$ representa residuos de aminoácido leucina (L) o prolina (P), X$_5$ representa residuos de aminoácido arginina (R), isoleucina (I), prolina (P) o serina (S), y X$_6$ representa residuos de aminoácido valina (V) o arginina (R); y en el que dicho anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende además una región VH que comprende la secuencia consenso de aminoácidos:

[FW$_5$]YYYMQ[FW$_6$]X$_7$IGSSGGVTNYADSVKG[FW$_7$]VGLGDAFDI[FW$_8$]

en la que [FW$_5$], [FW$_6$], [FW$_7$] y [FW$_8$] representan los residuos de aminoácido de la región 1 de entramado de VH (SEQ ID NO: 36), la región 2 de entramado de VH (SEQ ID NO: 37), la región 3 de entramado de VH (SEQ ID NO: 38) y la región 4 de entramado de VH (SEQ ID NO: 39), y en la que X$_7$ representa residuos de aminoácido tirosina (Y), isoleucina (I) o valina (V).

En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18, 19 y 20. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18, 19 y 20. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR2 que consiste en SEQ ID NO: 21. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 21. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR1 que consiste en SEQ ID NO: 31. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 31. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR3 que consiste en SEQ ID NO: 35. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención que comprende una VH-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 35.

En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18, 19 y 20, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18, 19 y 20, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR2 que consiste en SEQ ID NO: 21, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 21, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos.

En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR1 que consiste en SEQ ID NO: 31, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 31, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR3 que consiste en SEQ ID NO: 35, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 35, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos.

En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18, 19 y 20; una VL-CDR2 que consiste en SEQ ID NO: 21; y una VL-CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18, 19 y 20; una VL-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 21; y una VL-CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR1 que consiste en SEQ ID NO: 31; una VH-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34; y una VH-CDR3 que consiste en SEQ ID NO: 35. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 31; una VH-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34; una VH-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 35.

En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las

SEQ ID NO: 18, 19 y 20, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; una VL-CDR2 que consiste en SEQ ID NO: 21, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; y una VL-CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18, 19 y 20, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; a VL-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 21, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; y una VL-CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos.

En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH-CDR1 que consiste en SEQ ID NO: 31, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; una VH-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; y una VH-CDR3 que consiste en SEQ ID NO: 35, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo anticuerpo que comprende una VH-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 31, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; una VH-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; y VH-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 35, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos.

En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende modificaciones para CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena pesada y/o ligera, y comprende además modificaciones para FW1, FW2, FW3 y/o FW4 de la cadena pesada y/o ligera. En algunos aspectos, FW_1 comprende SEQ ID NO: 40 ó 44, FW_2 comprende SEQ ID NO: 41, FW_3 comprende SEQ ID NO: 42, FW_4 comprende SEQ ID NO: 43, FW_5 comprende SEQ ID NO: 36, FW_6 comprende SEQ ID NO: 37, FW_7 comprende SEQ ID NO: 38 y FW_8 comprende SEQ ID NO: 39.

En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a FW_1 que comprende SEQ ID NO: 40 ó 44, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; FW_2 comprende SEQ ID NO: 41, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; FW_3 comprende SEQ ID NO: 42, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; FW_4 comprende SEQ ID NO: 43, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; FW_5 comprende SEQ ID NO: 36, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; FW_6 comprende SEQ ID NO: 37, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; FW_7 comprende SEQ ID NO: 38, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; y FW_8 comprende SEQ ID NO: 39, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos.

En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL y una VH que comprende secuencias de aminoácidosecuencias de aminoácidos de VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 idénticas o idénticas excepto por cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos en una o más de las CDR a: las SEQ ID NO: 18, 21, 22, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 26, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 27, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 20, 21, 22, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 19, 21, 22, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 25, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 28, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 29, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 30, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 23, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 19, 21, 23, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 20, 21, 23, 31, 32 y 35, las SEQ ID NO: 18, 21, 24, 31, 32 y 35, o las SEQ ID NO: 18, 21, 25, 31, 32 y 35, respectivamente.

Los dominios variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación incluyen las secuencias enumeradas en la tabla 2.

Tabla 2

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
1	CL16VL (de línea germinal determinada)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLP GTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCAAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL
17	CL16VL (original)	QYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGSSSNIGLNYVSWYQQL PGTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCAAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL

2	CL16 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYYMQWVRQAPGKGLEWVSYIGSSGGVTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLGDAFDIWGQGTMVTVSS
4	5H6 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDGLPGEVFGGGTKLTVL
5	8A3 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLIGEVFGGGTKLTVL
6	4H6 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCRGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL
7	6E.3 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL
8	2B11 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLPGEVFGGGTKLTVL
9	2D1 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEAFGGGTKLTVL
10	3A6 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSPSGEVFGGGTKLTVL
11	4C4 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLRGEVFGGGTKLTVL
12	15D12.1 (15D12.I) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYYMQWVRQAPGKGLEWVSIIGSSGGVTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLGDAFDIWGQGTMVTVSS
13	15D12.2 (15D12.V) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYYMQWVRQAPGKGLEWVSVIGSSGGVTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLGDAFDIWGQGTMVTVSS

14	1A4 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLP GTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCAAWDDSPPGEAFGGGTKLTVL
3	2C2 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGLNYVSWYQQLP GTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCAAWDDSPPGEAFGGGTKLTVL
15	3E.1 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCRGSSSNIGLNYVSWYQQLP GTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCAAWDDSPPGEAFGGGTKLTVL
16	2F10	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLP GTAPKLLISRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCAAWDDSPSGEAFGGGTKLTVL

En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL de anticuerpo y una VH de anticuerpo, en el que la VL comprende una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos al menos aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, o aproximadamente el 100% idéntica a una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.

En otros aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL de anticuerpo y una VH de anticuerpo, en el que la VH comprende una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos al menos aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, o aproximadamente el 100% idéntica a una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

En otros aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VL que comprende una secuencia al menos aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, o aproximadamente el 100% idéntica a una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, y comprende además una VH que comprende una secuencia al menos aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, o aproximadamente el 100% idéntica a una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una VH de la tabla 2 y una VL de la tabla 2. Se designan anticuerpos a lo largo de la memoria descriptiva según sus cadenas VL. Las cadenas pesadas de los anticuerpos específicos dados a conocer en la presente memoria descriptiva corresponden a la cadena pesada original de CL16de CL16 (SEQ ID NO: 2). Por tanto, el “anticuerpo de CL16de CL16” es una IgG1 que comprende dos cadenas ligeras de CL16de CL16 originales (SEQ ID NO: 17) y dos cadenas pesadas originales de CL16de CL16 (SEQ ID NO: 2), mientras que el “anticuerpo 2C2” según la presente invención es una IgG1 que comprende dos cadenas ligeras de 2C2 (VL de 2C2 (SEQ ID NO: 3) y dos cadenas pesadas originales de CL16de CL16 (SEQ ID NO: 2).

En algunos aspectos de la presente invención, el anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región constante de cadena pesada o un fragmento de la misma. En algunos aspectos específicos, la región constante de cadena pesada es una región constante de IgG. La región constante de IgG puede

comprender una región constante de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en una región constante kappa y una región constante lambda.

En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a HER3 con sustancialmente la misma o mejor afinidad que el anticuerpo de CL16de CL16, que comprende la cadena pesada original de CL16de CL16 (SEQ ID NO: 2) y la cadena ligera de CL16de CL16 original (SEQ ID NO: 17). En determinados aspectos de la presente invención, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se une a HER3 con sustancialmente la misma o mejor afinidad que el anticuerpo 2C2, que comprende la cadena ligera de 2C2 (VL de 2C2 (SEQ ID NO: 3) y la cadena pesada original de CL16de CL16 (SEQ ID NO: 2).

En un aspecto de la presente invención, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a HER3 y a fragmentos antigénicos del mismo con una constante de disociación de k_d (k_{off}/k_{on}) de menos de 10^{-6} M, o de menos de 10^{-7} M, o de menos de 10^{-8} M, o de menos de 10^{-9}M, o de menos de 10^{-10} M, o de menos de 10^{-11} M, o de menos de 10^{-12}M, o de menos de 10^{-13} M. En un aspecto particular de la presente invención, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a HER3 y a fragmentos antigénicos del mismo con una constante de disociación de entre 2×10^{-10} M y 6×10^{-10} M.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se une a HER3 y/o a fragmentos antigénicos del mismo con una K_{off} de menos de 1×10^{-3} s^{-1}, o menos de $2\times10^{-3}s^{-1}$. En otros aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a HER3 y a fragmentos antigénicos del mismo con una K_{off} de menos de 10^{-3} s^{-1}, menos de 5×10^{-3} s^{-1}, menos de 10^{-4} s^{-1}, menos de 5×10^{-4} s^{-1}, menos de 10^{-5} s^{-1}, menos de 5×10^{-5} s^{-1}, menos de 10^{-6} s^{-1}, menos de 5×10^{-6} s^{-1}, menos de menos de 5×10^{-7} s^{-1}, menos de 10^{-8} s^{-1}, menos de 5×10^{-8} s^{-1}, menos de 10^{-9} s^{-1}, menos de 5×10^{-9} s^{-1}, o menos de 10^{-10} s^{-1}. En un aspecto particular, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se une a HER3 y/o a fragmentos antigénicos del mismo con una K_{off} de entre $0,5\times10^{4}$ s^{-1} y $2,0\times10^{-4}$ s^{-1}.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se une a HER3 y/o a fragmentos antigénicos del mismo con una constante de velocidad de asociación o velocidad k_{on} de al menos 10^{5} M^{-1} s^{-1}, al menos 5×10^{5} M^{-1} s^{-1}, al menos 10^{6} M^{-1} s^{-1}, al menos 5×10^{6} $M^{-1}s^{-1}$, al menos 10^{7} M^{-1} s^{-1}, al menos 5×10^{7} M^{-1} s^{-1}, o al menos 10^{8} M^{-1} s^{-1}, o al menos 10^{9} M^{-1} s^{-1}. En otro aspecto, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se une a HER3 y/o a fragmentos antigénicos del mismo con una constante de velocidad de asociación o velocidad k_{on} de entre 1×10^{5} M^{-1} s^{-1} y 6×10^{5} M^{-1} s^{-1}.

En un aspecto de la presente divulgación, las secuencias de VH y VL dadas a conocer en la tabla 1 pueden “mezclarse y aparearse” para crear otros anticuerpos anti-HER3 de la divulgación. En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a las secuencias de VH de 15D12.I y 15D12.V que se mezclan y aparean. De manera adicional o alternativa, las secuencias de VL de 5H6, 8A3, 4H6, 6E.3, 2B11, 2D1, 3A6, 4C4, 1A4, 2C2, 3E.1 pueden mezclarse y aparearse.

En determinados aspectos de la presente invención, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención comprende mutaciones que mejoran la unión a FcRn humano y mejoran la semivida del anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos, tales mutaciones son una mutación de metionina (M) a tirosina (Y) en la posición 252, una mutación de serina (S) a treonina (T) en la posición 254 y una mutación de treonina (T) a ácido glutámico (E) en la posición 256, numeradas según el índice EU como en Kabat (Kabat, *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, EE.UU. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, D.C.), introducidas en el dominio constante de una IgG1. Véase la patente estadounidense n.º 7.658.921. Se ha demostrado que este tipo de IgG mutante, denominada como un “mutante de YTE”, presenta una semivida aumentada en aproximadamente cuatro veces en comparación con las versiones de tipo natural del mismo anticuerpo (Dall’Acqua *et al.*, J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006)). En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio constante de IgG comprende una o más sustituciones de residuos de aminoácido en las posiciones 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, numeradas según el índice EU como en Kabat, en el que tales mutaciones aumentan la semivida sérica del anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunos aspectos de la presente invención, un mutante de YTE comprende además una sustitución en la posición 434 del dominio constante de IgG, numerada según el índice EU como en Kabat, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en triptófano (W), metionina (M), tirosina (Y) y serina (S). En otros aspectos, un mutante de YTE comprende además una sustitución en la posición 434 del dominio constante de IgG, numerada según el índice EU como Kabat, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en triptófano (W), metionina (M), tirosina (Y) y serina (S), y una sustitución en la posición 428 del dominio constante de IgG, numerada según el índice EU como en Kabat, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en treonina (T), leucina (L), fenilalanina (F) y serina (S).

En aún otro aspecto de la presente invención, un mutante de YTE comprende además una sustitución en la posición 434 del dominio constante de IgG, numerada según el índice EU como en Kabat, por tirosina (Y), y una sustitución

en la posición 257 del dominio constante de IgG, numerada según el índice EU como en Kabat, por leucina (L). En algunos aspectos, un mutante de YTE comprende además una sustitución en la posición 434 del dominio constante de IgG, numerada según el índice EU como en Kabat, por serina (S), y una sustitución en la posición 428 del dominio constante de IgG, numerada según el índice EU como en Kabat, por leucina (L).

En un aspecto específico según la presente invención, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena ligera de 2C2 (VL de 2C2; SEQ ID NO: 3), una región variable de cadena pesada de CL16de CL16 original (SEQ ID NO: 2) y un dominio constante de IgG1 que comprende una mutación de metionina (M) a tirosina (Y) en la posición 252, una mutación de serina (S) a treonina (T) en la posición 254 y una mutación de treonina (T) a ácido glutámico (E) en la posición 256 del dominio constante de IgG1, numeradas según el índice EU como en Kabat.

En determinados aspectos de la presente invención, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención comprende al menos una sustitución de aminoácidos de dominio constante de IgG seleccionada del grupo que consiste en:

1. (a) sustitución del aminoácido en la posición 252 por tirosina (Y), fenilalanina (F), triptófano (W) o treonina (T),
2. (b) sustitución del aminoácido en la posición 254 por treonina (T),
3. (c) sustitución del aminoácido en la posición 256 por serina (S), arginina (R), glutamina (Q), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D) o treonina (T),
4. (d) sustitución del aminoácido en la posición 257 por leucina (L),
5. (e) sustitución del aminoácido en la posición 309 por prolina (P),
6. (f) sustitución del aminoácido en la posición 311 por serina (S),
7. (g) sustitución del aminoácido en la posición 428 por treonina (T), leucina (L), fenilalanina (F) o serina (S),
8. (h) sustitución del aminoácido en la posición 433 por arginina (R), serina (S), isoleucina (I), prolina (P) o glutamina (Q),
9. (i) sustitución del aminoácido en la posición 434 por triptófano (W), metionina (M), serina (S), histidina (H), fenilalanina (F) o tirosina (Y), y
10. (j) una combinación de dos o más de dichas sustituciones,

en el que las posiciones se numeran según el índice EU como en Kabat, y en el que la IgG modificada tiene una semivida sérica aumentada en comparación con la semivida sérica de una IgG que tiene el dominio constante de IgG de tipo natural.

En otros aspectos, la presente divulgación se refiere a secuencias de aminoácidosecuencias de aminoácidos de la VH y/o la VL que pueden ser el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% similares a las secuencias expuestas anteriormente, y comprenden 1, 2, 3, 4, 5 o más sustituciones conservativas. Un anticuerpo HER3 que tiene regiones VH y VL que tienen alta (es decir, el 80% o mayor) similitud con las regiones VH de las SEQ ID NO: 2, 12 ó 13 y/o con las regiones de VL de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16 ó 17, respectivamente, puede obtenerse mediante mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican para las SEQ ID NO: 1-17, seguida por la prueba del anticuerpo alterado codificado para determinar la función retenida usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

La afinidad o avidez de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse de manera experimental usando cualquier método adecuado bien conocido en la técnica, por ejemplo, citometría de flujo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoanálisis (RIA) o cinética (por ejemplo, análisis BIACORE™). Pueden emplearse fácilmente formatos de ensayos de unión directa así como ensayos de unión competitiva (véase, por ejemplo, Berzofsky *et al.*, “Antibody-Antigen Interactions”, En Fundamental Immunology, Paul, W. E., ed., Raven Press: Nueva York, N.Y. (1984); Kuby, Immunology, W. H. Freeman and Company: Nueva York, N.Y. (1992); y los métodos descritos en el presente documento). La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en condiciones diferentes (por ejemplo, concentración de sal, pH, temperatura). Por tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno (por ejemplo, K_D o Kd, K_{on}, K_{off}) se realizan con disoluciones normalizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón normalizado, tal como se conoce en la técnica y tal como el tampón descrito en el presente documento.

Se conoce también en la técnica que las afinidades medidas usando el análisis BIACORE™ pueden variar

dependiendo de que uno de los reactivos se una al chip. A este respecto, la afinidad puede medirse usando un formato en el que el anticuerpo de selección como diana (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal de 2C2) se inmoviliza sobre el chip (denominado un formato “IgG inactiva”) o usando un formato en el que la proteína diana (por ejemplo, HER3) se inmoviliza sobre el chip (denominado, por ejemplo, un formato “HER3 inactivo”).

III. Moléculas de unión que se unen al mismo epítopo como anticuerpos anti-HER3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención

En otro aspecto, la presente divulgación comprende anticuerpos contra HER3 que se unen al mismo epítopo tal como hacen los diversos anticuerpos anti-HER3 descritos en el presente documento. El término “epítopo” tal como se usa en el presente documento se refiere a un determinante de proteína que puede unirse a un anticuerpo de la invención. Los epítopos consisten normalmente en agrupaciones de superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión al primero, pero no al último, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. Tales anticuerpos pueden identificarse basándose en su capacidad para competir de forma cruzada (por ejemplo, para inhibir de manera competitiva la unión de, en una manera estadísticamente significativa) con anticuerpos tales como el anticuerpo de CL16de CL16, el anticuerpo 2C2 o el mutante de 2C2-YTE, en ensayos de unión a HER3 convencionales. Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a anticuerpos anti-HER3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, anticuerpos humanos monoclonales, que compiten para unirse a HER3 con otro anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, tal como el anticuerpo de CL16de CL16 o el anticuerpo 2C2. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de, por ejemplo, el anticuerpo de CL16de CL16 o el anticuerpo 2C2 demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo para unirse a HER3; un anticuerpo de este tipo puede, según una teoría no limitativa, unirse al mismo o a un epítopo relacionado (por ejemplo, uno similar estructuralmente o próximo espacialmente) en HER3 como el anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo con el que compite. En un aspecto, el anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítopo en HER3 como, por ejemplo, el anticuerpo de CL16de CL16 o el anticuerpo 2C2, es un anticuerpo humano monoclonal.

IV. Mecanismo de acción

En algunos aspectos de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la fosforilación de HER3. En otros aspectos, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la fosforilación de AKT. En todavía otros aspectos, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la formación de dímeros HER2-HER3. En algunos aspectos, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el crecimiento celular. En algunos aspectos, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, carece de efecto de CCDA. En aspectos específicos, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la fosforilación de HER3, la fosforilación de AKT y/o la formación de colonias tumorales a través de un mecanismo de acción independiente de ligando.

En algunos aspectos de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de mama MCF-7 dirigidas por HRG tal como se mide mediante ELISA, con una CI_{50} menor de aproximadamente 30 ng/ml, menor de aproximadamente 25 ng/ml, menor de aproximadamente 20 ng/ml, menor de aproximadamente 15 ng/ml o menor de aproximadamente 10 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3 de la presente invención, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de mama MCF-7 dirigidas por HRG tal como se mide mediante ELISA, con una CI_{50} menor de aproximadamente 20 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3 de la presente invención, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de mama MCF-7 dirigidas por HRG tal como se mide mediante ELISA, con una CI_{50} menor de aproximadamente 15 ng/ml. En otro aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de mama MCF-7 dirigidas por HRG tal como se mide mediante ELISA, con una CI_{50} menor de aproximadamente 10 ng/ml.

En algunos aspectos de la invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención puede suprimir el crecimiento celular en células de cáncer de mama MDA-MB-175, con una CI_{50} menor de aproximadamente 0,90 μg/ml, menor de aproximadamente 0,80 μg/ml, menor de aproximadamente 0,70 μg/ml, menor de aproximadamente 0,60 μg/ml, menor de aproximadamente 0,50 μg/ml, menor de aproximadamente 0,40 μg/ml, menor de aproximadamente 0,30 μg/ml o menor de aproximadamente 0,20 μg/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención puede suprimir

el crecimiento celular en células de cáncer de mama MDA-MB-175, con una CI_{50} menor de aproximadamente 0,50 μg/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el crecimiento celular en células de cáncer de mama MDA-MB-175, con una CI_{50} menor de aproximadamente 0,40 μg/ml. En otro aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el crecimiento celular en células de cáncer de mama MDA-MB-175, con una CI_{50} menor de aproximadamente 0,30 μg/ml. En otro aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el crecimiento celular en células de cáncer de mama MDA-MB-175, con una CI_{50} menor de aproximadamente 0,20 μg/ml.

En algunos aspectos de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir el crecimiento celular en células de melanoma HMCB, con una CI_{50} menor de aproximadamente 0,20 μg/ml, menor de aproximadamente 0,15 μg/ml, menor de aproximadamente 0,10 μg/ml, menor de aproximadamente 0,05 μg/ml, menor de aproximadamente 0,04 μg/ml o menor de aproximadamente 0,03 μg/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir el crecimiento celular en células de melanoma HMCB, con una CI_{50} menor de aproximadamente 0,10 μg/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el crecimiento celular en células de melanoma HMCB, con una CI_{50} menor de aproximadamente 0,05 μg/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir el crecimiento celular en células de melanoma HMCB, con una CI_{50} menor de aproximadamente 0,04 μg/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir el crecimiento celular en células de melanoma HMCB, con una CI_{50} menor de aproximadamente 0,03 μg/ml.

En algunos aspectos de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 dirigidas por EGFR, con una CI_{50} menor de aproximadamente 20 ng/ml, menor de aproximadamente 15 ng/ml, menor de aproximadamente 10 ng/ml, menor de aproximadamente 8 ng/ml, menor de aproximadamente 6 ng/ml, menor de aproximadamente 4 ng/ml o menor de aproximadamente 2 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 dirigidas por EGFR, con una CI_{50} menor de aproximadamente 10 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 dirigidas por EGFR, con una CI_{50} menor de aproximadamente 8 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 dirigidas por EGFR, con una CI_{50} menor de aproximadamente 6 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 dirigidas por EGFR, con una CI_{50} menor de aproximadamente 4 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 dirigidas por EGFR, con una CI_{50} menor de aproximadamente 2 ng/ml.

En algunos aspectos, una molécula de unión a HER3 de la presente invención, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 dirigidas por EGFR resistentes a TKI, con una CI_{50} menor de aproximadamente 30 ng/ml, menor de aproximadamente 25 ng/ml, menor de aproximadamente 20 ng/ml, menor de aproximadamente 15 ng/ml, menor de aproximadamente 10 ng/ml o menor de aproximadamente 5 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 dirigidas por EGFR resistentes a TKI, con una CI_{50} menor de aproximadamente 20 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 dirigidas por EGFR resistentes a TKI, con una CI_{50} menor de aproximadamente 15 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 dirigidas por EGFR resistentes a TKI, con una CI_{50} menor de aproximadamente 10 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 dirigidas por EGFR resistentes a TKI, con una CI_{50} menor de

aproximadamente 5 ng/ml.

En algunos aspectos específicos de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede usarse para tratar cánceres resistentes a TKI.

En algunos aspectos, una molécula de unión a HER3 de la presente invención, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de adenocarcinoma gástrico humano MKN45 dirigidas por cMET, con una CI_{50} que es menor de aproximadamente 15 ng/ml, menor de aproximadamente 10 ng/ml, menor de aproximadamente 9 ng/ml, menor de aproximadamente 8 ng/ml, menor de aproximadamente 7 ng/ml, menor de aproximadamente 6 ng/ml, menor de aproximadamente 5 ng/ml o menor de aproximadamente 4 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de adenocarcinoma gástrico humano MKN45 dirigidas por cMET con una CI_{50} menor de aproximadamente 10 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de adenocarcinoma gástrico humano MKN45 dirigidas por cMET con una CI_{50} menor de aproximadamente 8 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de adenocarcinoma gástrico humano MKN45 dirigidas por cMET con una CI_{50} menor de aproximadamente 6 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de adenocarcinoma gástrico humano MKN45 dirigidas por cMET con una CI_{50} menor de aproximadamente 4 ng/ml.

En algunos aspectos de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, puede suprimir la pAKT en células MKN45 dirigidas por cMET, con una CI_{50} menor de aproximadamente 15 ng/ml, menor de aproximadamente 10 ng/ml, menor de aproximadamente 9 ng/ml, menor de aproximadamente 8 ng/ml, menor de aproximadamente 7 ng/ml, menor de aproximadamente 6 ng/ml, menor de aproximadamente 5 ng/ml, menor de aproximadamente 4 ng/ml o menor de aproximadamente 3 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la pAKT en células MKN45 dirigidas por cMET con una CI_{50} menor de aproximadamente 8 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la pAKT en células MKN45 dirigidas por cMET con una CI_{50} menor de aproximadamente 6 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la pAKT en células MKN45 dirigidas por cMET con una CI_{50} menor de aproximadamente 4 ng/ml. En un aspecto específico de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la pAKT en células MKN45 dirigidas por cMET con una CI_{50} menor de aproximadamente 3 ng/ml.

En algunos aspectos de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir el pHER en células de carcinoma gástrico humano de células en anillo de sello Kato III dirigidas por FGFR2, con una CI_{50} menor de aproximadamente 9 ng/ml, menor de aproximadamente 8 ng/ml, menor de aproximadamente 7 ng/ml, menor de aproximadamente 6 ng/ml, menor de aproximadamente 5 ng/ml, menor de aproximadamente 4 ng/ml, menor de aproximadamente 3 ng/ml, menor de aproximadamente 2 ng/ml o menor de aproximadamente 1 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el pHER en células de carcinoma gástrico humano de células en anillo de sello Kato III dirigidas por FGFR2, con una CI_{50} menor de aproximadamente 5 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el pHER en células de carcinoma gástrico humano de células en anillo de sello Kato III dirigidas por FGFR2, con una CI_{50} menor de aproximadamente 4 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el pHER en células de carcinoma gástrico humano de células en anillo de sello Kato III dirigidas por FGFR2, con una CI_{50} menor de aproximadamente 3 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el pHER en células de carcinoma gástrico humano de células en anillo de sello Kato III dirigidas por FGFR2, con una CI_{50} menor de aproximadamente 2 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el pHER en células de carcinoma gástrico humano de células en anillo de sello Kato III dirigidas por FGFR2, con una CI_{50} menor de aproximadamente 1 ng/ml.

En algunos aspectos de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la pAKT en células Kato III dirigidas por FGFR2, con una CI_{50} menor de aproximadamente 6 ng/ml, menor de aproximadamente 5 ng/ml, menor

de aproximadamente 4 ng/ml, menor de aproximadamente 3 ng/ml, menor de aproximadamente 2 ng/ml o menor de aproximadamente 1 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la pAKT en células Kato III dirigidas por FGFR2, con una CI_{50} menor de aproximadamente 4 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la pAKT en células Kato III dirigidas por FGFR2, con una CI_{50}menor de aproximadamente 3 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la pAKT en células Kato III dirigidas por FGFR2, con una CI_{50}menor de aproximadamente 2 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la pAKT en células Kato III dirigidas por FGFR2, con una CI_{50} menor de aproximadamente 1 ng/ml.

En algunos aspectos de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir el pHER en células de cáncer de mama BT-474 independientes del ligando, con una CI_{50} menor de aproximadamente 10 ng/ml, menor de aproximadamente 9 ng/ml, menor de aproximadamente 8 ng/ml, menor de aproximadamente 7 ng/ml, menor de aproximadamente 6 ng/ml, menor de aproximadamente 5 ng/ml, menor de aproximadamente 4 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el pHER en células de cáncer de mama BT-474 independientes del ligando, con una CI_{50} menor de aproximadamente 8 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el pHER en células de cáncer de mama BT-474 independientes del ligando, con una CI_{50} menor de aproximadamente 6 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el pHER en células de cáncer de mama BT-474 independientes del ligando, con una CI_{50} menor de aproximadamente 4 ng/ml.

En algunos aspectos de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede suprimir la pAKT en células de cáncer de mama BT-474 independientes del ligando, con una CI_{50} menor de aproximadamente 10 ng/ml, menor de aproximadamente 9 ng/ml, menor de aproximadamente 8 ng/ml, menor de aproximadamente 7 ng/ml, menor de aproximadamente 6 ng/ml, menor de aproximadamente 5 ng/ml, menor de aproximadamente 4 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la pAKT en células de cáncer de mama BT-474 independientes del ligando, con una CI_{50} menor de aproximadamente 8 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la pAKT en células de cáncer de mama BT-474 independientes del ligando, con una CI_{50} menor de aproximadamente 6 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir la pAKT en células de cáncer de mama BT-474 independientes del ligando, con una CI_{50} menor de aproximadamente 4 ng/ml. En algunos aspectos, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede suprimir el pHER3, la pAKT y la formación de colonias tumorales en células BT-474, un modelo de cáncer de mama independiente de ligando.

En algunos aspectos de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, puede suprimir la secreción de VEGF inducida por HRG. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, puede suprimir la secreción de VEGF inducida por HRG en células de cáncer de mama BT-474 independientes del ligando, y/o células de cáncer de mama MCF-7 dirigidas por HRG.

En algunos aspectos de la presente invención, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, puede producir la detención del ciclo celular. En un aspecto específico, una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, puede producir la detención del ciclo celular en células de cáncer de mama, incluyendo, pero sin limitarse a, células SKBR3 o BT474.

V. Preparación de anticuerpos anti-HER3 y fragmentos de unión a antígeno

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales anti-HER3 usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495. Usando el método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, se inmuniza tal como se describió anteriormente para lograr la producción mediante linfocitos de anticuerpos que se unirán específicamente a un antígeno inmunizante. También puede inmunizarse linfocitos *in vitro*. Tras la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que luego pueden seleccionarse de linfocitos y células de mieloma no fusionados. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno elegido tal como se determina mediante inmunoprecipitación, inmunotransferencia o mediante una ensayo de unión *in vitro* (por ejemplo, radioinmunoanálisis (RIA); ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)), luego puede propagarse o bien en cultivo *in vitro* usando métodos convencionales (Goding, Monoclonal

Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) o bien *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales luego pueden purificarse a partir del medio de cultivo o el fluido ascítico tal como se describió anteriormente para anticuerpos policlonales.

Alternativamente, los anticuerpos monoclonales anti-HER3 de la presente invención pueden obtenerse usando métodos de ADN recombinante tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.816.567. Los polinucleótidos que codifican para un anticuerpo monoclonal se aíslan a partir de células B maduras o una célula de hibridoma, tal como mediante TA-PCR usando cebadores oligonucleotídicos que amplifican específicamente los genes que codifican para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y su secuencia se determina usando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican para las cadenas pesada y ligera se clonan luego en vectores de expresión adecuados, que cuando se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra manera proteína inmunoglobulina, se generan anticuerpos monoclonales por las células huésped. Además, los anticuerpos monoclonales recombinantes anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de las especies deseadas pueden aislarse a partir de bibliotecas de visualización de fagos que expresan las CDR de las especies deseadas tal como se describe (McCafferty *et al.*, 1990, Nature, 348:552-554; Clarkson *et al.*, 1991, Nature, 352:624-628; y Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

El/los polinucleótido(s) que codifican para un anticuerpo anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención pueden modificarse además de varias maneras diferentes usando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunos aspectos de la presente invención, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón, pueden sustituirse (1) por aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano, para generar un anticuerpo quimérico o (2) por un polipéptido no inmunoglobulínico para generar un anticuerpo de fusión. En algunos aspectos, las regiones constantes se truncan o retiran para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. La mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable puede usarse para optimizar la especificidad, afinidad, etc., de un anticuerpo monoclonal.

En determinados aspectos de la presente invención, el anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos humanos pueden prepararse directamente usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Pueden generarse linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados a partir de un individuo inmunizado que produce un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (véase, por ejemplo, Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boemer *et al.*, 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; y la patente estadounidense 5.750.373).

Además, el anticuerpo anti-HER3 humano o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede seleccionarse de una biblioteca de fagos, en el que la biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos, tal como se describe, por ejemplo, en Vaughan *et al.*, 1996, Nat. Biotech., 14:309-314, Sheets *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci., 95:6157-6162, Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381, y Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Las técnicas para la generación y el uso de la biblioteca de fagos de anticuerpos también se describen en las patentes estadounidenses n.^{os} 5.969.108, 6.172.197, 5.885.793, 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915; 6.593.081; 6.300.064; 6.653.068; 6.706.484; y 7.264.963; y Rothe *et al.*, 2007, J. Mol. Bio., doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018.

Las estrategias de maduración por afinidad y las estrategias de intercambio de cadenas (Marks *et al.*, 1992, Bio/Technology 10:779-783) se conocen en la técnica y pueden emplearse para generar anticuerpos humanos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de alta afinidad.

En algunos aspectos de la presente invención, un anticuerpo monoclonal anti-HER3 puede ser un anticuerpo humanizado. Los métodos para modificar por ingeniería, humanizar o resuperficializar anticuerpos no humanos o humanos también se pueden usar y se conocen bien en la técnica. Un anticuerpo humanizado, resuperficializado o modificado por ingeniería de manera similar puede tener uno o más residuos de aminoácido de una fuente que es no humana, por ejemplo, pero sin limitarse a, ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos residuos de aminoácido no humanos se reemplazan por residuos que a menudo se denominan residuos de “importación”, que se toman normalmente de un dominio de “importación” variable, constante u otro de una secuencia humana conocida. Tales secuencias importadas pueden usarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, constante de asociación, constante de disociación, avidez, especificidad, semivida o cualquier otra característica adecuada, tal como se conoce en la técnica. En general, los residuos de las CDR se implican directa y lo más sustancialmente en influir en la unión de HER3. Por consiguiente, la totalidad o parte de las secuencias de CDR no humanas o humanas se mantienen mientras que las secuencias no humanas de las regiones variables y constantes pueden reemplazarse por aminoácidos humanos u otros.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden humanizarse, resuperficializarse, modificarse por ingeniería opcionalmente o modificarse por ingeniería anticuerpos humanos con la retención de alta afinidad por el antígeno HER3 y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este fin, pueden prepararse opcionalmente anticuerpos anti-HER3 humanizados (o humanos) o modificados por ingeniería y anticuerpos resuperficializados

mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados y modificados por ingeniería conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales, modificadas por ingeniería y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son familiares para los expertos en la técnica. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionadas. La inspección de estas estructuras permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno, tal como HER3. De esta manera, los residuos de las regiones de entramado (FW) pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias consenso y de importación de manera que se logra la característica del anticuerpo deseada, tal como la afinidad aumentada por el/los antígeno(s) diana.

La humanización, resuperficialización o modificación por ingeniería de anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención puede realizarse usando cualquier método conocido, tal como, pero sin limitarse a, los descritos en, Jones *et al.*, Nature 321:522 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534 (1988)), Sims *et al.*, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623 (1993), las patentes estadounidenses n.os 5.639.641, 5.723.323; 5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023; 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539; 4.816.567, 7.557.189; 7.538.195 y 7.342.110; las publicaciones de patentes internacionales n.os WO99/06834; WO97/20032; WO92/11272; WO92/03461; WO94/18219; WO90/05370; WO92/01047; WO93/06213; las publicaciones de solicitud de patentes internacionales n.os WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; y la publicación de patente europea n.º EP 229246.

Los anticuerpos anti-HER3 humanizados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención también pueden obtenerse en ratones transgénicos que contienen loci de inmunoglobulina humana que pueden producir, tras la inmunización, el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Este enfoque se describe en las patentes estadounidenses n.os 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016.

En determinados aspectos de la presente invención, se proporciona un fragmento de anticuerpo anti-HER3. Se conocen diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. De manera tradicional, estos fragmentos se derivan a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto *et al.*, 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; Brennan *et al.*, 1985, Science, 229:81). En determinados aspectos, se producen fragmentos de anticuerpo anti-HER3 de manera recombinante. Los fragmentos de anticuerpo de Fab, Fv y scFv pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli* u otras células huésped, permitiéndose así la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Tales fragmentos de anticuerpo anti-HER3 también pueden aislarse a partir de la biblioteca de fagos de anticuerpos comentada anteriormente. Los fragmentos de anticuerpo anti-HER3 también pueden ser anticuerpos lineales tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.641.870. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el médico experto.

Según la presente invención, pueden adaptarse técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos para HER3 de la presente invención (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.946.778). Además, pueden adaptarse métodos para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (véase, por ejemplo, Huse *et al.*, Science 246:1275-1281 (1989)) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para HER3, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Pueden producirse fragmentos de anticuerpo mediante técnicas en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a: (a) un fragmento F(ab')2 producido mediante la digestión de pepsina de una molécula de anticuerpo; (b) un fragmento Fab generado reduciendo los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')2, (c) un fragmento Fab generado mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor, y (d) fragmentos Fv.

Además, puede ser deseable, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpo, modificar un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención para aumentar su semivida sérica. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítopo de unión al receptor salvaje en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo mediante la mutación de la región apropiada en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o incorporando el epítopo en una etiqueta peptídica que luego se fusiona al anticuerpo o fragmento de anticuerpo en o bien el extremo o bien en el centro (por ejemplo, mediante síntesis de ADN o péptidos), o mediante mutación de YTE. Se conocen otros métodos para aumentar la semivida sérica de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, la conjugación a una molécula heteróloga tal como PEG en la técnica.

Los anticuerpos anti-HER3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos heteroconjugados están también dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se han propuesto tales anticuerpos, por ejemplo, para dirigir células inmunitarias a células no deseadas (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos anti-HER3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos heteroconjugados puedan prepararse *in vitro* usando

métodos conocidos en la química de síntesis de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuros o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo.

En determinados aspectos, las moléculas de unión a HER3 de la invención, es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden combinarse con otros agentes terapéuticos o conjugarse a otros agentes terapéuticos o toxinas para formar inmunoconjugados y/o proteínas de fusión. Los ejemplos de tales agentes terapéuticos y toxinas incluyen, pero no se limitan a, cetuximab (Erbitux®), panitumumab (Vectibix®), lapatinib (Tykerb®/Tyverb®) y paclitaxel (Taxol®, Abraxane®), y derivados (por ejemplo, docetaxel).

En algunos aspectos, las moléculas de unión a HER3 de la invención, es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden conjugarse a anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que seleccionan como diana el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En otros aspectos, los anticuerpos contra HER3 de la invención pueden conjugarse a inhibidores de la tirosina cinasa. En algunos aspectos específicos, los anticuerpos contra HER3 de la invención pueden conjugarse a inhibidores de la actividad de la tirosina cinasa asociados con EGFR y/o HER2/neu. En algunos aspectos, los anticuerpos contra HER3 de la invención pueden conjugarse a agentes antimitóticos. En algunos aspectos específicos, los anticuerpos contra HER3 de la invención pueden conjugarse a agentes que estabilizan el ensamblaje de microtúbulos fusiformes mitóticos.

Debe apreciarse que los anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que se proporciona para la asociación del anticuerpo o polipéptido con el HER3. Con respecto a esto, la región variable puede comprender o derivarse de cualquier tipo de mamífero que pueda inducirse a preparar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra antígeno asociado al tumor deseado. Como tal, la región variable de los anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos modificados puede ser, por ejemplo, de origen humano, murino, de primate no humano (por ejemplo, macacos cangrejeros, macacos, etc.) o lobuno. En algunos aspectos de la presente invención, tanto las regiones variables como las constantes de los anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos modificados son humanas. En otros aspectos, las regiones variables de anticuerpos compatibles (habitualmente derivados de una fuente no humana) pueden modificarse por ingeniería o adaptarse específicamente para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. A este respecto, las regiones variables útiles en la presente invención pueden humanizarse o alterarse de otra manera a través de la inclusión de secuencias de aminoácidosecuencias de aminoácidos importadas.

En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a moléculas en las que los dominios variables en ambas cadenas pesada y ligera de un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo se alteran mediante al menos la sustitución parcial de una o más de las CDR y, si es necesario, por la sustitución parcial de la región de entramado y el cambio de secuencias. Aunque las CDR pueden derivarse de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase como el anticuerpo del que se derivan las regiones de entramado, se prevé que las CDR se derivarán de un anticuerpo de diferente clase, y en determinados aspectos, de un anticuerpo de una especie diferente. No es necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donante para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. Por el contrario, sólo es necesario transferir los residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a antígeno. Dadas las explicaciones expuestas en las patentes estadounidenses n.os 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762, estará bien dentro de la competencia de los expertos en la técnica, o bien llevando a cabo experimentación de rutina o mediante pruebas de ensayo y error para obtener un anticuerpo funcional con inmunogenicidad reducida.

A pesar de las alteraciones a la región variable, los expertos en la técnica apreciarán que los anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos modificados de esta invención comprenderán anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o fragmentos inmunorreactivos de los mismos) en los que al menos un fracción de uno o más de los dominios de región constante se ha delecionado o alterado de otra manera, de manera que proporciona las características bioquímicas deseadas tales como localización tumoral aumentada o semivida sérica reducida cuando se compara con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o inalterada. En algunos aspectos, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones a la región constante compatibles con esta invención comprenden adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados dados a conocer en el presente documento pueden comprender alteraciones o modificaciones a uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio constante de cadena ligera (CL). En algunos aspectos, se contemplan regiones constantes modificadas en las que uno o más dominios se delecionan parcial o totalmente. En algunos aspectos, los anticuerpos modificados comprenderán constructos o variantes de dominio delecionado en los que se ha retirado el dominio CH2 completo (constructos ΔCH2). En algunos aspectos, el dominio de región constante omitido se reemplazará por un espaciador de aminoácidos corto (por ejemplo, de 10 residuos) que proporciona algo de la flexibilidad molecular normalmente otorgada por la región constante ausente.

Además de su configuración, se conoce en la técnica que la región constante media muchas funciones efectoras.

Por ejemplo, la unión del componente C1 de complemento a anticuerpos activa el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede implicarse en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a células a través de la región Fc, con un sitio receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une al receptor Fc (FcR) en una célula. Existen varios receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores eta), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc sobre las superficies celulares desencadena varias respuestas biológicas importantes y diversas, incluyendo la reabsorción y la destrucción de partículas recubiertas con anticuerpos, el aclaramiento de complejos inmunitarios, la lisis de células diana recubiertas con anticuerpos mediante linfocitos citolíticos (denominada citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, o CCDA), la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia placentaria y el control de la producción de inmunoglobulina.

En determinados aspectos de la presente invención, un anticuerpo anti-HER3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo proporciona funciones efectoras alteradas que, en cambio, afectan al perfil biológico del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo administrado. Por ejemplo, la deleción o inactivación (a través de mutaciones puntuales o de otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado circulante aumentándose así la localización tumoral. En otros casos, puede ser que las modificaciones de la región constante, consistentes con esta invención, moderen la unión al complemento y reduzcan así la semivida sérica y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Pueden usarse aún otras modificaciones de la región constante para eliminar uniones disulfuro o restos de oligosacáridos que permiten la localización mejorada debido a una especificidad de antígeno o flexibilidad de anticuerpo aumentada. De manera similar, pueden realizarse fácilmente modificaciones a la región constante según esta invención usando técnicas de ingeniería bioquímica o molecular bien conocidas dentro del alcance del experto en la técnica.

En determinados aspectos, una molécula de unión a HER3 de la presente invención que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no tiene una o más funciones efectoras. Por ejemplo, en algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no tiene actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y/o ni actividad de citotoxicidad dependiente de complementos (CDC). En determinados aspectos, el anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a un receptor Fc y/o a factores del complemento. En determinados aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no tiene función efectora.

Se observará que en determinados aspectos de la presente invención, los anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos modificados pueden modificarse por ingeniería para fusionar el dominio CH3 directamente a la región bisagra de los respectivos anticuerpos o fragmentos de los mismos modificados. En otros constructos puede ser deseable proporcionar un espaciador peptídico entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, pueden expresarse constructos compatibles en los que se ha delecionado el dominio CH2, y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) se liga a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Un espaciador de este tipo puede añadirse, por ejemplo, para asegurar que los elementos reguladores del dominio constante permanecen libres y accesibles o que la región bisagra permanece flexible. Sin embargo, debe observarse que los espaciadores de aminoácidos pueden, en algunos casos, demostrar ser inmunogénicos y desencadenar una respuesta inmunitaria no deseada contra el constructo. Por consiguiente, en determinados aspectos, cualquier espaciador añadido al constructo será relativamente no inmunogénico, o incluso se omitirá por completo, de manera que mantenga las cualidades bioquímicas de los anticuerpos modificados.

Además de la deleción de dominios de región constante completos, se apreciará que los anticuerpos anti-HER3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención pueden proporcionarse mediante la deleción o sustitución parcial de unos pocos o incluso un único aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión a Fc y aumentar así la localización tumoral. De manera similar, puede ser deseable simplemente delecionar esa parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, unión al complemento C1Q) que va a modularse. Tales deleciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, la semivida sérica) mientras que dejan otras funciones deseadas asociadas con el dominio de región constante del sujeto intactas. Además, tal como se hizo referencia anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos anti-HER3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden modificarse a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que potencian el perfil del constructo resultante. A este respecto, es posible alterar la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión a Fc) mientras que se mantiene sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo modificado de la presente invención. Determinados aspectos pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar las características deseables tales como la disminución o el aumento de la función efectora o para proporcionar más fijación de citotoxina o hidratos de carbono. En tales aspectos, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de región constante seleccionados.

La presente divulgación se refiere a variantes que son sustancialmente homólogas a los anticuerpos anti-HER3

quiméricos, humanizados y humanos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, expuestos en el presente documento. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservativa, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, la sustitución conservativa se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro dentro de la misma clase general tales como, por ejemplo, un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico por otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro. Lo que se pretende mediante la sustitución de aminoácidos conservativa se conoce bien en la técnica.

Un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención puede modificarse además para contener restos químicos adicionales que no forman parte normalmente de la proteína. Estos restos derivados pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica o la absorción de la proteína. Los restos también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario deseable de las proteínas y similares. Una visión general de estos restos puede encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

VI. Polinucleótidos que codifican para moléculas de unión a HER3

En determinados aspectos, la invención abarca polinucleótidos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican para un anticuerpo que se une específicamente a HER3 o a un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención. Por tanto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un anticuerpo anti-HER3 o codifica para un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de este tipo de la presente invención. Los polinucleótidos de la invención pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético; y puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante (antisentido).

En determinados aspectos de la presente invención, se aíslan los polinucleótidos. En determinados aspectos, los polinucleótidos son sustancialmente puros. En determinados aspectos, los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante para el polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura que para un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, en la expresión y secreción de un polipéptido a partir de una célula huésped (por ejemplo, una secuencia líder que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido de la célula). El polipéptido que tiene una secuencia líder es una preproteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula huésped para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar para una proproteína de unión a HER3, que es la proteína madura más los residuos de aminoácido en 5' adicionales.

En determinados aspectos, los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante para el polipéptido de unión a HER3 maduro, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo fusionado en el mismo marco de lectura que para una secuencia marcadora que permite, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexahistidina suministrada por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un huésped bacteriano, o la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) derivada de la proteína hemaglutinina de la gripe cuando se usa un huésped mamífero (por ejemplo, células COS-7).

La presente invención además se refiere a variantes de los polinucleótidos descritos que codifican para, por ejemplo, fragmentos de unión a HER3, análogos y derivados de los anticuerpos contra HER3 de la invención.

Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o en ambas. En algunos aspectos, las variantes de polinucleótidos contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones silenciosas, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunos aspectos, las variantes de nucleótidos se producen mediante sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Las variantes de polinucleótidos pueden producirse por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un huésped particular (cambiar los codones en el ARNm humano por los preferidos por un huésped bacteriano tal como *E. coli*). También se proporcionan vectores y células que comprenden los polinucleótidos descritos en el presente documento.

En algunos aspectos, una secuencia de ADN que codifica para una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede construirse mediante síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Tales oligonucleótidos pueden diseñarse basándose en la secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando los codones que están favorecidos en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés. Pueden aplicarse métodos convencionales para sintetizar una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica para un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, puede usarse una secuencia de aminoácidosecuencia de aminoácidos completa para construir un gen retrotraducido. Además, puede sintetizarse un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido aislado particular. Por ejemplo, pueden sintetizarse y luego ligarse varios oligonucleótidos pequeños que codifican para las porciones del polipéptido deseado. Los oligonucleótidos individuales contienen normalmente proyecciones en 5' o 3' para el ensamblaje complementario.

Una vez ensambladas (mediante síntesis, mutagénesis dirigida al sitio u otro método), las secuencias de polinucleótido que codifican para un polipéptido aislado particular de interés se insertarán en un vector de expresión y se ligarán de manera operativa a una secuencia de control de expresión apropiada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. El ensamblaje adecuado puede confirmarse por secuenciación de nucleótidos, cartografía de restricción y expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Tal como se conoce en la técnica, para obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen tiene que ligarse de manera operativa a secuencias de control de expresión transcripcionales y traduccionales que son funcionales en el huésped de expresión elegido.

En determinados aspectos de la presente invención, los vectores de expresión recombinantes se usan para amplificar y expresar ADN que codifica para anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención. Los vectores de expresión recombinantes son constructos de ADN que pueden replicarse que tienen fragmentos de ADN sintético o derivados de ADNc que codifican para una cadena de polipéptidos de un anticuerpo anti-HER3 y/o fragmento de unión a antígeno del mismo, ligados de manera operativa a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados derivados de genes de mamífero, microbianos, virales o de insecto. Una unidad transcripcional comprende generalmente un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en el ARNm y se traduce en la proteína y (3) secuencias de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción apropiadas, tal como se describe en detalle a continuación. Tales elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. Puede incorporarse adicionalmente la capacidad para replicarse en un huésped, habitualmente proporcionada por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes. Las regiones de ADN se ligan de manera operativa cuando se relacionan de manera funcional entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (líder secretor) se liga de manera operativa a un ADN por un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor se liga de manera operativa a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma se liga de manera operativa a una secuencia codificante si se posiciona de manera que permita la traducción. Los elementos estructurales destinados a su uso en sistemas de expresión de levaduras incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped. Alternativamente, cuando se expresa una proteína recombinante sin una secuencia líder o de transporte, puede incluirse un residuo de metionina N-terminal. Este residuo puede escindirse de manera opcional posteriormente a partir de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La elección de la secuencia de control de expresión y el vector de expresión dependerá de la elección del huésped. Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones huésped/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas, incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de VS40, papilomavirus bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *E. coli*, incluyendo pCR 1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de intervalo de huéspedes más amplio, tales como M13 y fagos de ADN monocatenario filamentosos.

Las células huésped adecuadas para la expresión de una molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención incluyen células procariotas, de levadura, de insecto o eucariotas superiores bajo el control de promotores adecuados. Las procariotas incluyen organismos gram negativo o gram positivo, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero tal como se describe a continuación. También pueden emplearse sistemas de traducción libre de células. Los vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levaduras y de mamíferos se describen por Pouwels *et al.* (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985). Puede encontrarse información adicional en cuanto a los métodos de producción de proteínas, incluyendo la producción de anticuerpos, por ejemplo, en la publicación de patente estadounidense n.º 2008/0187954, las patentes estadounidenses n.os 6.413.746 y 6.660.501 y la publicación de patente internacional n.º WO 04009823.

Pueden emplearse también de manera ventajosa diversos sistemas de cultivo celular de mamíferos o insectos para expresar moléculas de unión a HER3 recombinante, es decir, anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. La expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero puede realizarse porque tales proteínas se pliegan generalmente de manera correcta, se modifican de manera apropiada y completamente funcional. Los ejemplos de líneas celulares de huéspedes mamíferos adecuadas incluyen HEK-293 y HEK-293T, las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (Cell 23:175, 1981), y otras líneas celulares incluyendo, por ejemplo, líneas celulares de células L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), NSO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador adecuado ligado al gen que va a expresarse, y otras secuencias no transcritas flanqueantes en 5' o 3' y secuencias no traducidas en 5' o 3', tales como sitios de unión a ribosoma, un sitio de poliadenilación, sitios aceptores y donantes de corte y empalme y secuencias de terminación transcripcionales necesarios. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de

insectos se revisan en Luckow y Summers, BioTechnology 6:47 (1988).

Las moléculas de unión a HER3, es decir, anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención producidos por un huésped transformado, pueden purificarse según cualquier método adecuado. Tales métodos convencionales incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, por afinidad y en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Pueden fijarse etiquetas de afinidad a la proteína, tales como hexahistidina, un dominio de unión a maltosa, una secuencia de recubrimiento de la gripe y glutatión-S-transferasa, para permitir una purificación fácil mediante el paso a través de una columna de afinidad adecuada. Las proteínas aisladas también pueden caracterizarse físicamente usando tales técnicas como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X.

Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante en medios de cultivo pueden concentrarse en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada. Alternativamente, puede emplearse una resina de intercambio aniónica, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Alternativamente, puede emplearse una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Finalmente, pueden emplearse una o más etapas de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) que emplean medios de RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene metilo colgante u otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente un anticuerpo contra HER3. Pueden emplearse algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

Una proteína de unión a HER3 recombinante, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, producida en un cultivo bacteriano puede aislarse, por ejemplo, mediante la extracción inicial de sedimentos celulares, seguida por una o más etapas de concentración, desestabilización salina, intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión molecular. Puede emplearse cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para las etapas finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden alterarse mediante cualquier método conveniente, incluyendo el ciclo de congelación-descongelación, la sonicación, la alteración mecánica o el uso de agentes de lisis celular.

Los métodos conocidos en la técnica para purificar anticuerpos y otras proteínas también incluyen, por ejemplo, los descritos en las publicaciones de patentes estadounidenses n.os 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005.

La presente divulgación también se refiere a una molécula de unión a HER3 que es un polipéptido que no es un anticuerpo. Se conocen en la técnica una variedad de métodos para identificar y producir polipéptidos que no son anticuerpos que se unen con alta afinidad a una diana proteínica. Véanse, por ejemplo, Skerra, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304 (2007), Hosse *et al.*, Protein Science, 15:14-27 (2006), Gill *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658 (2006), Nygren, FEBS J., 275:2668-76 (2008), y Skerra, FEBS J., 275:2677-83 (2008). En determinados aspectos, puede usarse tecnología de exposición de fagos para identificar/producir un polipéptido de unión a HER3. En determinados aspectos, el polipéptido comprende un armazón proteínico de un tipo seleccionado del grupo que consiste en proteína A, una lipocalina, un dominio de fibronectina, un dominio consenso de repetición de anquirina y tiorredoxina.

VI. Anticuerpos anti-HER3 para su uso en tratamiento farmacológico

La invención se refiere a moléculas de unión anti-HER3, es decir, anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención, para su uso en el tratamiento de pacientes que tienen una enfermedad asociada con la expresión de HER3 o células que expresan HER3. Por “célula que expresa HER3” se entiende una célula que expresa HER3. Los métodos para detectar la expresión de HER3 en células son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, técnicas de PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo, inmunotransferencia de tipo Western, ELISA, y similares.

Aunque la siguiente descripción se refiere al uso y tratamiento diagnóstico de diversas enfermedades y trastornos con un anticuerpo contra HER3 de la invención, los usos descritos en el presente documento también son aplicables a anticuerpos anti-HER3, y los fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de estos anticuerpos anti-HER3 que retengan las propiedades deseadas de los anticuerpos anti-HER3 de la invención, por ejemplo, que puedan unirse específicamente a HER3 y neutralizar la actividad de HER3. En algunos aspectos, los anticuerpos contra HER3 de la presente invención son anticuerpos humanos o humanizados que no median la CCDA humana, o se seleccionan de anticuerpos anti-HER3 conocidos que no median la CCDA, o son anticuerpos anti-HER3 que se modifican por ingeniería de manera que no median la CCDA. En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo monoclonal de 2C2 En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo monoclonal de 2C2 modificado por ingeniería para prolongar la semivida sérica. En otros aspectos, la molécula de unión a HER3

es un anticuerpo mutante de 2C2-YTE.

En un aspecto, el tratamiento incluye una molécula de unión anti-HER3, es decir, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención actual, para su uso en un sujeto o paciente, o la aplicación o administración del anticuerpo anti-HER3 a un tejido o una línea celular aislados de un sujeto o paciente, en el que el sujeto o paciente tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad. En otro aspecto, el tratamiento también se pretende que incluya una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión anti-HER3, es decir, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la invención actual, para su uso en un sujeto o paciente, o aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-HER3 a un tejido o una línea celular aislados de un sujeto o paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad.

Las moléculas de unión anti-HER3, es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención, son útiles para el tratamiento de diversos cánceres. En un aspecto, la invención se refiere a moléculas de unión anti-HER, es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, para su uso como medicamento, en particular para su uso en el tratamiento o profilaxis de cáncer. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de mama.

Según la presente invención, al menos una molécula de unión anti-HER3, es decir, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se define en otra parte en el presente documento, se usa para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto al cáncer. El término “respuesta terapéutica positiva” con respecto al tratamiento de cáncer se refiere a una mejora en la enfermedad junto con la actividad de estas moléculas de unión anti-HER3, es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Por tanto, por ejemplo, una mejora en la enfermedad puede caracterizarse como una respuesta completa. Por “respuesta completa” se entiende una ausencia de enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier resultado de prueba previo. Alternativamente, una mejora en la enfermedad puede categorizarse como una respuesta parcial. Una “respuesta terapéutica positiva” abarca una reducción o inhibición de la progresión y/o duración del cáncer, la reducción o mejora de la gravedad del cáncer y/o la mejora de uno o más síntomas del mismo que resultan de la administración de un anticuerpo anti-HER3 de la invención. En aspectos específicos, tales términos se refieren a uno, dos o tres o más resultados tras la administración de anticuerpos anti-HER3 de la invención: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células cancerosas; (2) una estabilización o reducción en el crecimiento del cáncer; (3) una alteración en la formación del cáncer; (4) erradicación, eliminación o control del cáncer primario, regional y/o metastásico; (5) una reducción en la mortalidad; (6) un aumento en la supervivencia, duración o tasa global y/o sin enfermedad, sin recaída, sin progresión; (7) un aumento en la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta o el número de pacientes que responden o están en remisión; (8) una disminución en la tasa de hospitalización, (9) una disminución en la duración de la hospitalización, (10) el tamaño del cáncer se mantiene y no aumenta o aumenta en menos del 10%, preferiblemente menos del 5%, preferiblemente menos del 4 %, preferiblemente menos del 2%, y (12) un aumento en el número de pacientes en remisión.

La respuesta clínica puede evaluarse utilizando técnicas de detección tales como imágenes de resonancia magnética (IRM), imágenes radiográficas, barrido tomográfico computerizado (CT), citometría de flujo o análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), histología, anatomía patológica macroscópica y análisis bioquímico de la sangre, que incluyen, pero no se limitan a, cambios detectables mediante ELISA, RIA, cromatografía, y similares. Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto sometido a terapia con la molécula de unión anti-HER3, es decir, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, puede experimentar el efecto beneficioso de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad.

Las moléculas de unión anti-HER3, es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, pueden usarse en combinación con cualquier terapia conocida para el cáncer, incluyendo cualquier agente o combinación de agentes que se conoce que son útiles, o que se han usado o están actualmente en uso para el tratamiento de cáncer, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello y cáncer de mama. El segundo agente o combinación de agentes de la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación tiene preferiblemente actividades complementarias al anticuerpo o polipéptido de la invención de manera que no se afecten de manera adversa entre sí.

Los agentes antineoplásicos incluyen fármacos usados para tratar tumores malignos, tales como crecimientos cancerosos. La farmacoterapia puede usarse sola, o en combinación con otros tratamientos tales como cirugía o radioterapia. Pueden usarse varias clases de fármacos en el tratamiento de cáncer, dependiendo de la naturaleza del órgano implicado. Por ejemplo, los cánceres de mama se estimulan comúnmente por estrógenos, y pueden tratarse con fármacos que inactivan las hormonas sexuales. De manera similar, el cáncer de próstata puede tratarse con fármacos que inactivan los andrógenos, la hormona sexual masculina. Los agentes antineoplásicos para su uso según la presente invención incluyen, entre otros, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos que se unen a IGF-1R, anticuerpos que se unen a EGFR, anticuerpos que se unen a HER2, anticuerpos que se unen a HER3 o anticuerpos

que se unen a cMET), moléculas pequeñas que seleccionan como diana IGF1R, moléculas pequeñas que seleccionan como diana EGFR, moléculas pequeñas que seleccionan como diana HER2, antimetabolitos, agentes alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa, agentes que seleccionan como diana microtúbulos, inhibidores de cinasas, inhibidores de la síntesis de proteínas, agentes inmunoterapéuticos, terapias hormonales, glucocorticoides, inhibidores de la aromatasa, inhibidores de mTOR, agentes quimitoterápicos, inhibidores de la proteína cinasa B, inhibidores de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), inhibidores de la cinasa dependiente de ciclina (CDK), RLr9, CD289, inhibidores de enzimas, anti-TRAIL, inhibidores de MEK, etc.

En aspectos específicos, las moléculas de unión a HER3 de la invención, es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden administrarse en combinación con anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que seleccionan como diana el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), por ejemplo, cetuximab (Erbitux®, Imclone), panitumumab (Vectibix®, Amgen), matuzumab/EMD72000 (Merck Serono), oligoclonal MM-151 (Merrimack), nimotuzumab (TheraCIM, InnGene Kalbiotechy), GA201/RG7160 (Roche), Sym004 (Symphogen), MEHD-7945A (dual específico contra EGFR/HER3, Genentech). En otros aspectos específicos, las moléculas de unión a HER3 de la invención, es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden administrarse en combinación con anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que seleccionan como diana HER2, por ejemplo, pertuzumab (rhuMAb 2C4/Omnitarg®, Genentech), trastuzumab (Herceptin®, Genentech/Roche), MM-111 (anticuerpo biespecífico contra HER2/HER3, Merrimack, por ejemplo, el documento WO 2009/126920). En todavía otros aspectos específicos, las moléculas de unión a HER3 de la invención, es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden administrarse en combinación con anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que también seleccionan como diana HER3, por ejemplo, MEHD-7945A/RG7597 (específico dual contra EGFR/HER3, Genentech, por ejemplo, el documento WO 2010108127), MM-121 (Merrimack, por ejemplo, el documento WO 2008/100624), MM-111 (anticuerpo biespecífico contra HER2/HER3, Merrimack, por ejemplo, el documento WO 2009/126920), AV-203 (Aveo, por ejemplo, el documento WO 2011/136911), AMG888 (Amgen, el documento WO 2007/077028), HER3-8 (ImmunogGen, por ejemplo, el documento WO 2012/019024). En aspectos específicos adicionales, las moléculas de unión a HER3 de la invención, es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden administrarse en combinación con anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que seleccionan como diana HER4. En un aspecto específico, los anticuerpos contra HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con un anticuerpo que selecciona como diana EGFR o HER2 (por ejemplo, cetuximab o trastuzumab). En un aspecto específico adicional, los anticuerpos contra HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con conjugados anticuerpo-fármaco que seleccionan como diana HER2 (por ejemplo, trastuzumab emtansina, Genentech/Roche). Se contempla que los anticuerpos contra HER3 de la invención potencien la internalización y degradación de un correceptor inducidas por la unión de un anticuerpo al correceptor, potenciándose así la eficacia de un anticuerpo y/o conjugado anticuerpo-fármaco que selecciona como diana EGFR, HER2 y/o HER4.

En otros aspectos, los anticuerpos contra HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con inhibidores de la tirosina cinasa. En algunos otros aspectos específicos, los anticuerpos contra HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con inhibidores de la actividad de la tirosina cinasa asociada con EGFR y/o HER2/neu, por ejemplo, lapatinib. En aspectos específicos, los anticuerpos contra HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con inhibidores de moléculas pequeñas del/de los receptor(es) del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, EGFR, HER2, HER4), por ejemplo, gefitinib (Iressa®, Astrazeneca); canertinib/CI-1033 (Pfizer); lapatinib (Tykerb®, GlaxoSmithKline), erlotinib (Tarceva®, OSI Pharma), afatinib (Tovok®/Tomtovok®, Boehringer Ingelheim), neratinib (HKI-272, Pfizer).

En algunos aspectos, los anticuerpos contra HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con agentes antimitóticos. En algunos aspectos específicos, los anticuerpos contra HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con agentes que estabilizan el ensamblaje de microtúbulos fusiformes mitóticos, por ejemplo, paclitaxel o docetaxel.

En algunos aspectos, los anticuerpos contra HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con inhibidores de MEK (cinasa de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), también conocida como MAPKK), por ejemplo, selumetinib (AZD6244, ARRY-142866, AstraZeneca), WX-554 (Wilex), trametinib (GlaxoSmithKline), refametinib (Ardea Biosciences), E-6201 (Eisai), MEK-162 (Novartis). En un aspecto particular, la combinación de un inhibidor de MEK y un anticuerpo contra HER3 de la invención es más eficaz que cualquier otro agente solo. En un aspecto específico, un anticuerpo contra HER3 de la invención se administra en combinación con selumetinib.

Cuando las terapias combinadas comprenden la administración de un anticuerpo anti-HER3 en combinación con la administración de otro agente terapéutico, el uso abarca la administración conjunta, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden. En algunos aspectos, los anticuerpos anti-HER3 de la presente invención se administran en combinación con otros fármacos, en los que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y el/los agente(s) terapéutico(s) se puede(n) administrar secuencialmente, en cualquier orden o de manera simultánea (es decir, de manera concurrente o dentro del mismo periodo de tiempo).

La terapia de combinación terapia puede proporcionar “sinergia” y probar “sinérgico”, es decir, el efecto logrado

cuando los principios activos se usan juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan del uso de los compuestos por separado. Puede lograrse un efecto sinérgico cuando los principios activos: (1) se coformulan y se administran, o se administran de manera simultánea en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) se administran por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se administra en terapia por alternancia, puede lograrse un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran de manera secuencial, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia por alternancia, se administra de manera secuencial una dosis eficaz de cada principio activo, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, las dosis eficaces de dos o más principios activos se administran juntas.

En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, puede administrarse en una combinación sinérgica con un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En algunos aspectos, el inhibidor del EGFR es un anticuerpo. En aspectos específicos, el anticuerpo inhibidor del EGFR es Erbitux® (cetuximab) o panitumumab (Vectibix®). En aspectos específicos, las moléculas de unión a HER3 de la invención, es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden administrarse en una combinación sinérgica con inhibidores de la actividad de la tirosina cinasa asociada con EGFR y/o HER2/neu, por ejemplo, lapatinib. En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, puede administrarse en una combinación sinérgica con un inhibidor de HER2. En algunos aspectos, el inhibidor de HER2 es un anticuerpo. En aspectos específicos, el anticuerpo inhibidor de HER2 es pertuzumab (rhuMAb 2C4/Omnitarg®, Genentech), trastuzumab (Herceptin®, Genentech/Roche) o trastuzumab emtansina (Genentech/Roche). En aspectos específicos, las moléculas de unión a HER3 de la invención, es decir, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden administrarse en una combinación sinérgica con inhibidores de la actividad de la tirosina cinasa asociada con HER2/neu, por ejemplo, lapatinib. En algunos aspectos, los anticuerpos contra HER3 de la invención pueden administrarse en una combinación sinérgica con un agente antimitótico. En algunos aspectos específicos, el agente antimitótico estabiliza el ensamblaje de microtúbulos fusiformes mitóticos. En algunos aspectos específicos, el agente antimitótico es paclitaxel o docetaxel. En algunas realizaciones específicas, el anticuerpo 2C2 puede administrarse en una combinación sinérgica con un inhibidor del receptor del factor de crecimiento (EGFR). En algunas realizaciones específicas, el inhibidor del EGFR es un anticuerpo. En realizaciones específicas, el anticuerpo inhibidor del EGFR administrado de manera sinérgica con el anticuerpo 2C2 es Erbitux® (cetuximab). En realizaciones específicas, el anticuerpo 2C2 puede administrarse en una combinación sinérgica con inhibidores de la actividad de la tirosina cinasa asociada con EGFR y/o HER2/neu, por ejemplo, lapatinib. En algunas realizaciones, el anticuerpo 2C2 puede administrarse en una combinación sinérgica con un agente antimitótico. En algunas realizaciones específicas, el agente antimitótico administrado de manera sinérgica con el anticuerpo 2C2 estabiliza el ensamblaje de microtúbulos fusiformes mitóticos. En algunas realizaciones específicas, el agente antimitótico administrado de manera sinérgica con el anticuerpo 2C2 es paclitaxel.

En un aspecto, el cáncer comprende la mutación de KRAS. En aspectos específicos, la mutación de KRAS se localiza en el codón 12 de un gen KRAS humano. Tal como se demuestra en la sección de los ejemplos, los anticuerpos anti-HER3 dados a conocer en el presente documento pueden inhibir el crecimiento de células tumorales que comprende una mutación de KRAS, incluso cuando se usa un único agente (monoterapia) o en combinación con otro agente terapéutico.

Las moléculas de unión anti-HER3, es decir, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención, también pueden usarse para la monitorización diagnóstica de niveles de proteína en tejido como parte de un procedimiento de pruebas clínicas, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. Por ejemplo, puede facilitarse la detección acoplando el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos del material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S o ^{3}H.

VII. Composiciones farmacéuticas para uso terapéutico

Los métodos de preparación y administración de moléculas de unión anti-HER3, es decir, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, a un sujeto que los necesita, se conocen bien o se determinan fácilmente por los expertos en la técnica. La vía de administración de la molécula de unión anti-HER3, es decir, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Sin embargo, compatible con las enseñanzas en el presente documento, las moléculas de unión anti-HER3, es decir, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, pueden administrarse directamente al

sitio de la población celular adversa aumentándose así la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Tal como se comenta en el presente documento, las moléculas de unión anti-HER3, es decir, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, pueden administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de enfermedades mediadas por células que expresan HER3 tales como determinados tipos de cánceres.

Las composiciones farmacéuticas usadas en esta invención pueden comprender portadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo, por ejemplo, agua, intercambiadores de iones, proteínas, sustancias tampón y sales. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión. Las formulaciones adecuadas para su uso en el tratamiento terapéutico dado a conocer en el presente documento se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16ª ed. (1980). En algunos aspectos, los anticuerpos contra HER3 de la invención se formulan en una composición estable refrigerante (2-8ºC). En un aspecto particular, la composición estable refrigerante comprende histidina/HCl de histidina 25 mM, sacarosa 205 mM, polisorbato 80 al 0,02% a pH 6,0. En otro aspecto particular, los anticuerpos contra HER3 de la invención se formulan a 25-100 mg/ml en la composición estable refrigerante.

En cualquier caso, las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando un compuesto activo (por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, solo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado seguido de esterilización filtrada. Además, las preparaciones pueden envasarse y venderse en forma de kit. Tales artículos de fabricación pueden tener etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece de, o está predispuesto a, una enfermedad o un trastorno.

Las formulaciones parenterales pueden ser una dosis única de bolo, una infusión o una dosis de bolo de carga seguida de una dosis de mantenimiento. Estas composiciones pueden administrarse a intervalos fijos o variables específicos, por ejemplo, una vez al día, o "según sea necesario".

La composición puede administrarse como una dosis única, dosis múltiples o durante un periodoperiodo de tiempo establecido en una infusión. Los regímenes de dosificación también pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica).

Las dosis terapéuticamente eficaces de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de enfermedades mediadas por células que expresan HER3 tales como determinados tipos de cánceres que incluyen, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de mama, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluidos los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos, incluyendo los mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento pueden ajustarse usando métodos de rutina conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y la eficacia.

La cantidad de al menos una molécula de unión anti-HER3, es decir, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la presente invención que va a administrarse, se determina fácilmente por un experto habitual en la técnica sin experimentación indebida dada la divulgación de la presente invención. Los factores que influyen en el modo de administración y la cantidad respectiva de al menos una molécula de unión anti-HER3, es decir, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad, el historial de la enfermedad y la edad, la altura, el peso, la salud y el estado físico del individuo que se somete a terapia. Del mismo modo, la cantidad de la molécula de unión anti-HER3, es decir, el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención que va a administrarse, dependerá del modo de administración y de si el sujeto se someterá a una dosis única o a dosis múltiples de este agente.

La presente invención también proporciona para el uso de una molécula de unión anti-HER3, es decir, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, en la fabricación de un medicamento para tratar un tipo de cáncer, incluyendo, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de mama.

La invención también proporciona el uso de una molécula de unión anti-HER3, es decir, un anticuerpo de la invención o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto para tratar un tipo de cáncer. En determinados aspectos, el medicamento se usa en un sujeto que ha sido tratado previamente con al menos otra terapia. Por "tratado previamente" o "tratamiento previo" se entiende que el sujeto ha recibido una o más terapias (por ejemplo, ha sido tratado con al menos otra terapia antineoplásica) antes de recibir el medicamento que comprende la molécula de unión anti-HER3, es decir, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención. No es necesario que el sujeto respondiera al tratamiento previo con la terapia o terapias previas. Por tanto, el sujeto que recibe el medicamento que comprende la molécula de unión anti-HER3, es decir, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo

de la presente invención, puede haber respondido, o puede no haber respondido, al tratamiento previo con la terapia previa, o a una o más de las terapias anteriores en las que el tratamiento previo comprendía múltiples terapias.

La invención también proporciona la administración conjunta de una molécula de unión anti-HER3, es decir, un anticuerpo de la invención o fragmento de unión a antígeno del mismo, y al menos otra terapia. El anticuerpo anti-HER3 y la al menos otra terapia pueden administrarse conjuntamente en una única composición o pueden administrarse conjuntamente al mismo tiempo o en tiempos de solapamiento en composiciones separadas.

La invención también proporciona el uso de una molécula de unión anti-HER3, es decir, un anticuerpo de la invención o fragmento de unión a antígeno del mismo, en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto para tratar cáncer, en la que el anticuerpo anti-HER3 se administra antes de que un sujeto haya sido tratado con al menos otra terapia.

VIII. Pruebas diagnósticas

La divulgación proporciona además un método diagnóstico útil durante el diagnóstico de enfermedades mediadas por células que expresan HER3, tales como determinados tipos de cáncer que incluyen, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de mama, lo que implica medir el nivel de expresión de la proteína HER3 o el transcrito en el tejido u otras células o líquido corporal de un individuo, y comparar el nivel de expresión medido con un nivel de expresión de HER3 habitual en tejido o líquido corporal normal, por lo que un aumento en el nivel de expresión en comparación con el habitual es indicativo de un trastorno.

Los anticuerpos anti-HER3 de la invención y fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de los mismos, pueden usarse para analizar los niveles de proteína HER3 en una muestra biológica utilizando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, véase Jalkanen, *et al.*, J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen *et al.*, J. Cell Biol. 105: 3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión de la proteína HER3 incluyen inmunoensayos, como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoprecipitación o inmunotransferencia de tipo Western. Los ensayos adecuados se describen con más detalle en otra parte en el presente documento.

Por “analizar el nivel de expresión de polipéptido contra HER3” se pretende medir o estimar cualitativa o cuantitativamente el nivel del polipéptido contra HER3 en una primera muestra biológica, o bien de manera directa (por ejemplo, determinando o estimando el nivel absoluto de proteína) o bien de manera relativa (por ejemplo, comparando con el nivel de polipéptido asociado a la enfermedad en una segunda muestra biológica). El nivel de expresión del polipéptido contra HER3 en la primera muestra biológica puede medirse o estimarse y compararse con un nivel de polipéptido contra HER3 habitual, tomándose el patrón de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o determinándolo promediando los niveles de una población de individuos que no tienen el trastorno. Como se apreciará en la técnica, una vez que se conozca el nivel de polipéptido contra HER3 “habitual”, se puede usar de manera repetida como un patrón para la comparación.

La divulgación se refiere además a un método diagnóstico útil durante el diagnóstico de enfermedades mediadas por células que expresan HER3, tales como determinados tipos de cáncer que incluyen, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de mama, que implica medir el nivel de actividad de la proteína HER3 en el tejido u otras células o líquido corporal de un individuo, y comparar el nivel de actividad medido con un nivel de actividad HER3 habitual en tejido o líquido corporal normal, por lo que un aumento en el nivel de actividad en comparación con el habitual es indicativo de un trastorno.

La divulgación se refiere además a un método diagnóstico útil durante el tratamiento de enfermedades mediadas por células que expresan HER3, tales como determinados tipos de cáncer que incluyen, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de mama, que implica medir el nivel de actividad de la proteína HER3 en el tejido u otras células o líquido corporal de un individuo durante el tratamiento de una enfermedad mediada por células que expresan HER3, y comparar el nivel de actividad medido con un nivel de actividad HER3 habitual en tejido o líquido corporal normal y/o comparar el nivel de actividad medido con un nivel de actividad HER3 habitual en tejido o líquido corporal obtenido del individuo antes del tratamiento, por lo que una disminución en el nivel de actividad en comparación con el habitual es indicativo de una inhibición de la actividad de HER3.

Por “ensayo del nivel de actividad de la proteína HER3” se pretende medir o estimar cualitativa o cuantitativamente la actividad de la proteína HER3 en una primera muestra biológica, o bien de manera directa (por ejemplo, determinando o estimando el nivel de actividad absoluta) o de manera relativa (por ejemplo, comparando con el nivel de actividad en una segunda muestra biológica). El nivel de actividad de la proteína HER3 en la primera muestra biológica puede medirse o estimarse y compararse con una actividad habitual de la proteína HER3, tomándose el patrón de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o determinándolo promediando los niveles de una población de individuos que no tienen el trastorno o de un individuo antes del

tratamiento. Como se apreciará en la técnica, una vez que se conozca el nivel de actividad de la proteína HER3 “habitual”, puede usarse repetidamente como patrón para la comparación. En determinados aspectos, el nivel de actividad de HER3 en una muestra biológica se mide o estima o compara detectando la HER3 fosforilada en una muestra biológica. En un aspecto específico, el nivel de actividad de HER3 en una muestra biológica se mide, estima o compara detectando la HER3 fosforilada en una biopsia de piel, en la que la piel se estimula con HRG antes o después de la biopsia.

Por “muestra biológica” se entiende cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, una línea celular, un cultivo de tejidos u otra fuente de células que expresan de manera potencial HER3. Los métodos para obtener biopsias de tejidos y líquidos corporales de mamíferos se conocen bien en la técnica.

La presente divulgación también proporciona que la bioactividad de un inhibidor de HER3 (por ejemplo, anticuerpo anti-HER3 de la invención y fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados del mismo) administrado a un sujeto puede detectarse usando un ensayo *ex vivo*. En aspectos particulares, el ensayo *ex vivo* comprende detectar el nivel de HER3 fosforilada en una biopsia de piel, en el que la piel se estimula con HRG antes o después de la biopsia. La divulgación también proporciona que las biopsias de piel coincidentes se toman de un sujeto al que se le ha administrado el inhibidor de HER3. La divulgación también proporciona que se inyecta HRG debajo de una primera área de la piel y se inyecta un tampón de control debajo de una segunda área de la piel de un sujeto al que se le administró el inhibidor de HER3, en el que después de una cantidad de tiempo deseada (por ejemplo, 10-60 minutos) se toma una biopsia de las áreas primera y segunda de la piel. La divulgación también proporciona que una primera biopsia de piel se trata con HRG y una segunda biopsia de piel se trata con un tampón de control, en el que la primera y la segunda biopsias son biopsias de piel coincidentes tomadas de un sujeto al que se le ha administrado el inhibidor de HER3. La presente divulgación también proporciona que el nivel de HER3 fosforilada se detecta en las biopsias de piel. La presente divulgación también proporciona que se determina la diferencia en el nivel de HER3 fosforilada entre la primera (tratada con HRG) y la segunda biopsia (tratada con tampón de control). La divulgación también proporciona que la biopsia de piel se homogeneíza y el nivel de HER3 fosforilada se detecta mediante ELISA. La divulgación también proporciona que los niveles de HER3 fosforilada en las biopsias de piel de un sujeto al que se le ha administrado el inhibidor de HER3 se comparan con los niveles de HER3 fosforilada en biopsias de piel de un sujeto de control al que no se le ha administrado el inhibidor de HER3, en el que la reducción en el nivel de HER3 fosforilada en las biopsias de piel del sujeto al que se le ha administrado el inhibidor de HER3 es una medida de la bioactividad del inhibidor de HER3. La divulgación también proporciona que los niveles de HER3 fosforilada en las biopsias de piel de un sujeto al que se le ha administrado el inhibidor de HER3 se comparan con los niveles de HER3 fosforilada en biopsias de piel del mismo sujeto tomadas antes de la administración del inhibidor de HER3, en el que una reducción en el nivel de HER3 fosforilada en las biopsias de la piel del sujeto después de la administración del inhibidor de HER3 es una medida de la bioactividad del inhibidor de HER3. La presente divulgación también se refiere a métodos tal como se detalla en la sección de ejemplos 5.15.

IX. Kits que comprenden moléculas de unión a HER3

La presente invención proporciona kits que comprenden la molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, descrita en el presente documento y que pueden usarse para realizar los métodos descritos en el presente documento. En determinados aspectos, un kit comprende al menos un anticuerpo anti-HER3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención purificado en uno o más recipientes. En algunos aspectos, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, incluidos todos los controles, las instrucciones para realizar ensayos y cualquier software necesario para el análisis y la presentación de resultados. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que la molécula de unión a HER3, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede incorporarse fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que se conocen bien en la técnica.

X. Inmunoensayos

Las moléculas de unión anti-HER3, es decir, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, pueden analizarse para la unión inmunoespecífica mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse incluyen, entre otros, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como inmunotransferencias de tipo Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas), inmunoensayos de tipo “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar sólo algunos. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, Eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) vol. 1).

Las moléculas de unión a HER3, es decir, los anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, pueden emplearse de manera histológica, como en ensayos de inmunofluorescencia, microscopía inmunoelectrónica o no inmunológicos, para la detección *in situ* de receptores de HER3 o variantes o fragmentos peptídicos de los mismos conservados. La detección *in situ* puede lograrse retirando una muestra

histológica de un paciente y aplicando a la misma una molécula de unión a HER3 marcada, es decir, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, variante o derivado del mismo, preferiblemente aplicada mediante la superposición de la molécula de unión a HER3 marcada (es decir, un anticuerpo o fragmento) en una muestra biológica. Mediante el uso de un procedimiento de este tipo, es posible determinar no sólo la presencia de HER3, o variantes o fragmentos peptídicos conservados, sino también su distribución en el tejido examinado. Usando la presente invención, los expertos en la técnica percibirán fácilmente que cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (como los procedimientos de tinción) pueden modificarse para lograr tal detección *in situ*.

La actividad de unión de un lote dado de molécula de unión a HER3, es decir, anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede determinarse según métodos bien conocidos. Los expertos en la técnica podrán determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación de rutina.

Los métodos y reactivos adecuados para la determinación de las características de unión de una molécula de unión a HER3 aislada, es decir, el anticuerpo anti-HER3 o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, se conocen en la técnica y/o están disponibles comercialmente. El equipo y el software diseñados para tales análisis cinéticos están disponibles comercialmente (por ejemplo, BIAcore, software BIAevaluation, GE Healthcare; software KinExa, Sapidyne Instruments).

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro del conocimiento de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) ADN Cloning, volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis *et al.* Patente estadounidense n.º 4.683.195; Hames y Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames y Higgins, eds. (1984) Transcription And Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzimes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller y Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds, Methods In Enzymology, vols. 154 y 155; Mayer y Walquer, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, Londres); Weir y Blackwell, eds, (1986) Handbook Of Experimental Immunology, volúmenes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel *et al.* (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Los principios generales de la ingeniería de anticuerpos se exponen en Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2ª ed.; Oxford Univ. Press). Los principios generales de la ingeniería de proteínas se exponen en Rickwood *et al.*, eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press en Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Los principios generales de anticuerpos y la unión del anticuerpo-hapteno se exponen en: Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2ª ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); y Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman y Hall, Nueva York, N.Y.). De manera adicional, los métodos habituales en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente se siguen generalmente como en Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites *et al.*, eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8ª ed.; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) y Mishell y Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman y Co., NY).

Los trabajos de referencia habituales que exponen los principios generales de la inmunología incluyen Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York; Klein (1982) J. Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett *et al.*, eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) “Monoclonal Antibody Technology” en Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden *et al.*, (Elsevere, Ámsterdam); Goldsby *et al.*, eds. (2000) Kuby Immunnology (4ª ed.; H. Freemand & Co.); Roitt *et al.* (2001) Immunology (6ª ed.; Londres: Mosby); Abbas *et al.* (2005) Cellular and Molecular Immunology (5ª ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann y Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlan); Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall2003); Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach y Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press).

Ejemplos

Los aspectos de la presente divulgación pueden definirse adicionalmente en referencia a los siguientes ejemplos, que describen en detalle la preparación de determinados anticuerpos de la presente divulgación y el uso de los anticuerpos de la presente divulgación.

Ejemplo 1. Métodos para el aislamiento/optimización de anticuerpos monoclonales anti-HER3

1.1. Antígenos y líneas celulares

La quimera humana recombinante Herl(ECD)/Fc, la quimera humana HER2(ECD)/Fc, la quimera humana HER3(ECD)/Fc y la Her4(ECD)/Fc humana se compraron de R&D Systems (Mineápolis, MN) y se fusionaron con la etiqueta de histidina 6X C-terminal a través de un péptido ligador. La quimera recombinante de ratón HER3(ECD)/Fc se generó internamente. Se cultivaron células de cáncer de mama KPL-4 humano en DMEM complementado con suero bovino fetal al 5% (FBS).

1.2. Selección de bibliotecas de proteínas de unión a HER3 - Identificación del anticuerpo del clon 16 (CL16)

Se usaron los HER3(ECD)/Fc biotinilados y no etiquetados como dianas para la selección de las proteínas de unión a HER3 de la biblioteca de exposición de fagos de Fab humano Fab 310 de Dyax (Dyax, Cambridge, MA). Se realizaron dos brazos de selección: selección capturada y selección en disolución. Para la selección capturada, se incubaron primero los fagos de entrada con IgG policlonal humana capturada en inmunotubos a través de proteína A/G recombinante inmovilizada, y luego se seleccionaron con diana no marcada capturada en inmunotubos a través de proteína A/G recombinante inmovilizada.

En la selección en disolución, se permitió incubar los fagos de entrada con IgG policlonal humana, perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina con biotina extinguida para la deselección y luego se seleccionaron con diana biotinilada con incubación posterior con perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina para capturar el fago unido a la diana. Después de eliminar el fago no unido lavando de manera exhaustiva con TPBS (1xPBS/Tween-20 al 0,1%), se eluyeron los fagos unidos con TEA 100 mM (trietilamina). El fago eluido y el fago restante en las perlas de la selección de disolución se amplificaron posteriormente y se sometieron a rondas adicionales de selección. Se llevaron a cabo tres rondas de selección para cada brazo de selección.

El porcentaje de fagos de unión positiva osciló entre menos del 1% usando selección de captura hasta el 68% usando tres rondas de una selección de disolución (tabla 3).

Tabla 3: Cribado de proteínas de unión a HER3.

Selección	Selección capturada	Segunda ronda en selección de disolución	Tercera ronda en selección de disolución
Total de clones cribados	380	285	475
Clones positivos	1	7	322
Tasa positiva (%)	<1	2	68

1.3. Cribado para proteínas de unión a HER3 humanas y de ratón mediante ELISA de fagos

Se cribaron los fagos enriquecidos de las rondas de selección segunda y tercera mediante ELISA de fagos para la unión a HER3 humano y de ratón. Se recubrieron las placas de media área de 96 pocillos con 5 μg/ml, 50 μl por pocillo de antígenos diferentes diluidos en 1xPBS, pH 7,4 durante la noche a 4ºC. Se bloquearon las placas recubiertas con leche desnatada al 3% (p/v) en TPBS durante 1 hora a temperatura ambiente, y se lavaron dos veces con TPBS. Luego se incubaron las placas durante 1 h con sobrenadante de fagos durante la noche. Después de lavar diez veces con TPBS, se incubaron las placas con anticuerpo anti-M13 conjugado (HRP) con peroxidasa de rábano durante 1 hora, y se lavaron diez veces. Se revelaron las placas con disolución de sustrato de peroxidasa de tetrametilbencidina (TMB), se detuvieron las reacciones con 0,18 M de H_2SO_4, y se leyeron las placas a 450 nm en un lector de placas de ELISA.

Se identificaron 29 proteínas de unión positivas únicas que producían reacción cruzada para HER3 murino (como una fusión de HER3-Fc). Ninguna de las proteínas de unión identificadas mostró reactividad cruzada para HER2 o Her4 (datos no mostrados).

1.4. Reformateo de los Fab en anticuerpos frente a IgG completos y expresión

Se generaron la cadena ligera variable (VL) y la cadena pesada variable (VH) de la inmunoglobulina de los clones de fagos positivos por PCR y se insertaron en un vector de expresión de IgG1 humana que contenía la región constante de la cadena ligera lambda y la región CH1-bisagra-CH2-CH3 de IgG1. Para expresar los anticuerpos frente a IgG1, se transfectaron de manera transitoria las células de riñón embrionario humano 293-F con los vectores de IgG reformateados usando el reactivo 293fectin™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se cosecharon los medios acondicionados 10 días después de la transfección, se agruparon y se esterilizaron por filtración. Se purificaron las IgG1 usando perlas de proteína A. Se dializaron las IgG1 eluidas finales contra PBS, y se determinaron las concentraciones de

IgG1 mediante un ensayo de cuantificación de proteínas.

Se reformateó el clon 16 (CL16; las SEQ ID NO: 1 y 2, secuencias de aminoácidos de VL y VH, respectivamente) para IgG1 humana.

1.5. Determinación de la internalización del anticuerpo del clon 16 (CL16) mediante inmunofluorescencia

Se marcaron las células de cáncer de mama humano KPL-4 con el anticuerpo del clon 16 (CL16). La incubación de las células con CL16 condujo a un aumento de la endocitosis de HER3, lo que impidió que el receptor formara complejos de señalización activos con HER2 en la superficie celular.

Se dejaron internalizar los anticuerpos de CL16 fijados a la superficie celular incubando las células en condiciones de crecimiento durante o bien cero (no internalizado) o bien 2,5 horas (internalizado) (figura 1). Luego se fijaron todas las células con paraformaldehído al 3,7%, se lavaron en PBS, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5% en PBS y se tiñeron con 1 μg/ml de anticuerpo de cabra anti-IgG humana Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) antes de la adición de medio de montaje Antifade y examen de microscopía fluorescente. Se encontró que el anticuerpo de CL16 se internalizaba en las células KPL-4. A tiempo cero, las células KPL-4 mostraron una intensa tinción de la superficie celular (figura 1, 0 horas, panel superior), después de la incubación en condiciones de crecimiento durante 2,5 horas, la tinción de la superficie celular disminuyó y se reemplazó por tinción puntuada intracelular indicativa de internalización (figura 1, 2,5 horas, paneles inferiores).

1.6. Construcción de un vector de fagos que expresa Fab del clon 16

Se clonó el ADN que codifica el fragmento de unión a antígeno (Fab) del anticuerpo del clon 16 en un vector de expresión de fagos basado en M13 modificado previamente descrito por Dall'Acqua *et al.* (Dall'Acqua *et al.*, 2005, Methods. 36: 43-60). En este vector modificado, se modificó por ingeniería un ADN de región constante lambda (λ) humana en lugar de la cadena ligera kappa (κ) humana. La expresión del fragmento Fab está bajo el control del promotor LacZ y la secreción del fragmento Fab se habilita por las secuencias de señal del fago P3 fusionadas a los extremos N-terminales de las cadenas de la VH y VL del fragmento Fab. Se llevó a cabo la clonación mediante mutagénesis de hibridación según lo descrito por Kunkel (Kunkel, T. A., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU; 82:488-492) y Wu (Wu, H., 2003, Methods Mol. Biol.207:197-212).

Brevemente, se amplificaron las regiones variables de la IgG del clon 16 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante hibridación seguida por reacción de polimerización del ADN, se integró la región ligera variable del clon 16 en entramado con la región constante lambda humana, y se clonó la región pesada variable en entramado con la región constante 1 de cadena pesada humana (CH1), respectivamente. Luego se hizo crecer el vector del fago que contenía el fragmento Fab del clon 16 en la cepa CJ236 de *Escherichia coli* para producir uridina (U) que contiene ADN monocatenario (ADNmc) según lo descrito por Wu y An (Wu, H. y An, LL., 2003, Methods Mol. Biol.207: 213-33). Se usó la uridina que contenía ADNmc como molde para introducir mutaciones diseñadas para mejorar la afinidad de unión a HER3.

1.7. Determinación de la línea germinal del clon 16 (CL16)

El análisis de secuencia muestra que los entramados de VH del clon 16 (CL16) comparten una identidad de secuencia del 100% con el gen de la línea germinal de VH 3-23, mientras que los entramados de VL difieren en 6 posiciones de su gen de línea germinal más cercano 47*01. Se realizó la mutagénesis directa en el sitio para cambiar todos y cada uno de los aminoácidos que difieren del gen 47*01 de la línea germinal. Específicamente, se introdujeron mutaciones de seis puntos en las regiones variables de la cadena ligera de la siguiente manera: Y2S, E3V, S18R, M21I, H38Q y S50Y, en las que la primera letra representa el código de aminoácidos de una letra del clon 16 original, el número representa el número de residuo del entramado (según Kabat), y la segunda letra representa el código de aminoácidos de una letra de la secuencia de la línea germinal. Véanse las secuencias en la figura 2A y en la figura 2C, correspondientes al CL16 de VL original y al CL16 de VL de línea germinal determinada (GL), respectivamente. Se expresaron las variantes resultantes como Fab y se determinó su unión a la proteína HER3 recombinante mediante ELISA.

Los resultados de la unión mostraron que la mutación de aminoácidos H38Q en la región de entramado 2 mejoró la unión sobre el clon 16 parental medido mediante ELISA. Por el contrario, la mutación S49Y en la misma región de entramado tuvo un impacto negativo sobre la unión. Otras mutaciones puntuales no mostraron impacto sobre la unión de HER3. El mutante de línea germinal completamente determinada con los 6 aminoácidos mutados no de línea germinal mostró un grado similar de unión reducida como la mutación puntual S50Y, lo que indica que el aminoácido S50 participa en la unión. Las pruebas adicionales del clon con todas las mutaciones puntuales de la línea germinal excepto S50Y retuvieron y/o aumentaron la unión a HER3 en comparación con el clon 16 parental. Este clon de línea germinal parcialmente determinada, clon 16 (GL) (también denominado aquí “GL-P6”), se usó como molde para la optimización de afinidad adicional.

1.8. Optimización de la afinidad del clon 16 (CL16)

Cada aminoácido de las 6 regiones determinantes de complementariedad (CDR) del clon de línea germinal determinada GL-P6 se mutó de manera individual a otros 20 aminoácidos usando un método de mutagénesis de hibridación (Kunkel, 1985). Se usaron dos conjuntos de cebadores de ADN, uno que contiene un codón NSS que codifica para 8 aminoácidos y el otro que contiene un codón NWS que codifica para 12 aminoácidos diferentes, para introducir mutaciones en cada posición de CDR seleccionada como diana. Los cebadores degenerados individuales se usaron en reacciones de mutagénesis de hibridación. Brevemente, se fosforiló cada cebador degenerado, luego se usó en una razón de 10:1 con el ADNmc del Fab de GL-16 uridinilado. Se calentó la mezcla a 95ºC y luego se enfrió hasta 55ºC durante 1 hora. Posteriormente, se añadieron T4 ligasa y T7 ADN polimerasa y se incubó la mezcla durante 1,5 horas a 37ºC. Se agruparon los productos de síntesis para las CDR de la VH y la VL respectivamente; sin embargo, las bibliotecas NSS y NWS se mantuvieron separadas y se cribaron de forma independiente. Normalmente, se sometió a electroporación 1 μl del ADN de la biblioteca agrupada en XL1-Blue para la formación de placa sobre césped bacteriano XL1-Blue o para la producción de fragmentos Fab (Wu y An, 2003).

1.9. Cribado primario de la biblioteca de Fab

El cribado primario consistió en un ensayo ELISA de punto único (SPE) que se llevó a cabo usando sobrenadante de cultivo de bacterias cultivadas en placas de 96 pocillos (pocillo profundo) e infectadas con clones M13 recombinantes individuales tal como se describe en otra parte (Wu y An, 2003). Brevemente, este ELISA de captura implicó el recubrimiento de pocillos individuales de una inmunoplaca Maxisorp de 96 pocillos con aproximadamente 50 ng de un anticuerpo anti-Fd humano de oveja (Biodesign International, ME) en un tampón de carbonato a pH 8,5 durante la noche a 4ºC. Al día siguiente, se bloqueó la placa con BSA al 3% en tampón de PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se añadió el sobrenadante de Fab a la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado, se añadieron 0,1 μg de proteína HER3 biotinilada al pocillo y se incubó la mezcla durante 1,5 h a temperatura ambiente. Esto se siguió por incubación con conjugado neutravidina-peroxidasa de rábano (HRP) (Pierce, IL) durante aproximadamente 40 minutos a temperatura ambiente. Se detectó la actividad de HRP con sustrato de tetrametilbencidina (TMB) y se extinguió la reacción con H_2SO_4 0,2 M. Se leyeron las placas a 450 nm.

Se recogieron los clones que exhibieron una señal de densidad óptica (DO) a 450 nm mayor que el Fab del clon GL-P6 parental y se recrecieron (15 ml) (Wu y An, 2003) y se volvieron a analizar mediante ELISA (tal como se describió anteriormente) por duplicado confirmar los resultados positivos Se secuenciaron los clones que exhibieron de manera repetida una señal mayor que la del Fab de GL-P6. Luego se determinó la concentración de proteína de Fab de cada clon que tuvo un cambio de CDR mediante un ELISA cuantitativo de Fab, en el que se usó un Fab con concentración conocida como referencia. Se determinó la concentración de Fab comparando las señales de ELISA con las señales generadas por el Fab de referencia. Se repitió el ensayo de unión una vez más para todas las variantes positivas en concentraciones de Fab normalizadas para determinar la afinidad de unión relativa de los Fab mutantes y el Fab del GL-P6 parental.

El ELISA de unión mostró que dos variantes de VH, designadas como clon 14C7 y clon 15D12, que contenían las mutaciones puntuales Y50I o Y50V, respectivamente, en CDR2 mostraron una mejora de aproximadamente 5 veces en la unión a HER3 sobre el clon GL-P6 de línea germinal determinada parental. En la campaña de mutagénesis de la VL, se identificaron varias mutaciones individuales en la CDR1, por ejemplo, el clon 4H6 (que comprende la mutación puntual S24R), el clon 6E3 (que comprende la mutación puntual S27L) o en la CDR3, por ejemplo, el clon 5H6 (que comprende la mutación puntual S94G), el clon 8A3 (que comprende la mutación puntual S96aI), el clon 4C4 (que comprende la mutación puntual S96aR), el clon 2B11 (que comprende la mutación puntual S96aP) y el clon 2D1 (que comprende la mutación V97A) que muestran una unión mejorada.

De manera más particular, la sustitución del aminoácido S96a de VL-CDR3 con o bien isoleucina (I), arginina (R) o prolina (P) dio como resultado una mejora de la unión de 3,5 veces, 8,6 veces y 32 veces, respectivamente.

1.10. Cribado combinatorio de la biblioteca de Fab

Se combinaron las mutaciones puntuales en VH y VL determinadas como beneficiosas para la unión a HER3 adicionalmente para obtener sinergia de unión adicional. Se expresaron los mutantes combinatorios como Fab y se cribaron usando ELISA de unión a HER3. Si bien la combinación de una cualquiera de las mutaciones puntuales Y50I o Y50V en la cadena VH del fragmento Fab con las mutaciones de la VL parecía no ser beneficiosa pero redujo la unión a HER3, la combinación de varias mutaciones de la VL mejoró la unión adicionalmente. Estas combinaciones de mutaciones de la VL incluyen las combinaciones en el clon 1A4 (que comprende las mutaciones puntuales L96P, S97P y V100A), el clon 2C2 (que comprende las mutaciones puntuales S26L, L96P, S97P y V100A), el clon 2F10 (que comprende las mutaciones S97P y V100A) y el clon 3E1 (que comprende las mutaciones puntuales S23R, L96P, S97P y V100A).

1.11. Conversión de las variantes de Fab optimizadas por afinidad para el formato de IgG y expresión de anticuerpos

Se convirtieron las variantes de mutantes únicos y mutantes de combinación que muestran una unión mejorada al

formato de IgG para una caracterización adicional. Se amplificaron las regiones variables de cada variante mediante PCR usando cebadores que codificaban para sitios de restricción para facilitar la clonación en un vector de expresión de mamífero de IgG para la expresión usando células HEK 293F. Se purificaron las proteínas de IgG1 humana solubles, secretadas de los medios acondicionados directamente en columnas de proteína A HiTrap de 1 ml (GE Healthcare, NJ) según las instrucciones del fabricante. Las muestras purificadas de IgG1 humana (homogeneidad normalmente>95%, según lo juzgado por la electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamina) se dializaron contra PBS, se ultracongelaron y se almacenaron a -70ºC.

Se examinó la unión de las IgG purificadas usando un ELISA de unión a HER3. La combinación de IgG mutantes mostró una unión mejorada tal como se determina mediante la señal de unión total, mostrando 2C2 la mejora de unión más significativa sobre el clon 16 parental y otras variantes mutantes de combinación. La unión de las IgG al HER3 murino y de macaco cangrejero también se sometió a prueba mediante ELISA. Los resultados mostraron una unión mejorada de los mutantes de combinación a estas especies de HER3 parálogo.

La alineación de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y pesada para cada una de las mutaciones únicas identificadas se muestra en la figura 2A y la figura 2B, respectivamente. La tabla 4 proporciona las SEQ ID NO para cada clon. Se proporciona una alineación de las regiones variables de cadena ligera para cada uno de los clones de combinación en la figura 2C.

Tabla 4

SEQ ID	DESCRIPCIÓN	SEQ ID	DESCRIPCIÓN
17	aa de la V_L del clon 16	21	aa de la CDR2 de la V_L del clon 4H6
1	aa de la V_L del clon 16 de línea germinal determinada	22	aa de la CDR3 de la V_L del clon 4H6
2	aa de la V_H del clon 16	7	aa de la V_L del clon 6E.3
18	aa de la CDR1 de la V_L del clon 16	19	aa de la CDR1 de la V_L del clon 6E.3
21	aa de la CDR2 de la V_L del clon 16	21	aa de la CDR2 de la V_L del clon 6E.3
22	aa de la CDR3 de la V_L del clon 16	22	aa de la CDR3 de la V_L del clon 6E.3
31	aa de la CDR1 de la V_H del clon 16	9	aa de la V_L del clon 2D1
32	aa de la CDR2 de la V_H del clon 16	18	aa de la CDR1 de la V_L del clon 2D1
35	aa de la CDR3 de la V_H del clon 16	21	aa de la CDR2 de la V_L del clon 2D1
8	aa de la V_L del clon 2B11	28	aa de la CDR3 de la V_L del clon 2D1
18	aa de la CDR1 de la V_L del clon 2B11	10	aa de la V_L del clon 3A6
21	aa de la CDR2 de la V_L del clon 2B11	18	aa de la CDR1 de la V_L del clon 3A6
25	aa de la CDR3 de la V_L del clon 2B11	21	aa de la CDR2 de la V_L del clon 3A6
14	aa de la V_L del clon 1A4	29	aa de la CDR3 de la V_L del clon 3A6
18	aa de la CDR1 de la V_L del clon 1A4	11	aa de la V_L del clon 4C4
21	aa de la CDR2 de la V_L del clon 1A4	18	aa de la CDR1 de la V_L del clon 4C4
22	aa de la CDR3 de la V_L del clon 1A4	21	aa de la CDR2 de la V_L del clon 4C4
3	aa de la V_L del clon 2C2	30	aa de la CDR3 de la V_L del clon 4C4
19	aa de la CDR1 de la V_L del clon 2C2	12	aa de la V_H del clon 15D12.1
21	aa de la CDR2 de la V_L del clon 2C2	31	aa de la CDR1 de la V_H del clon 15D12.1
23	aa de la CDR3 de la V_L del clon 2C2	33	aa de la CDR2 de la V_H del clon 15D12.1

16	aa de la V_L del clon 2F10	35	aa de la CDR3 de la V_H del clon 15D12.1
18	aa de la CDR1 de la V_L del clon 2F10	13	aa de la V_H del clon 15D12.2
21	aa de la CDR2 de la V_L del clon 2F10	31	aa de la CDR1 de la V_H del clon 15D12.2
24	aa de la CDR3 de la V_L del clon 2F10	34	aa de la CDR2 de la V_H del clon 15D12.2
15	aa de la V_L del clon 3E.1	35	aa de la CDR3 de la V_H del clon 15D12.2
20	aa de la CDR1 de la V_L del clon 3E.1	36	aa de la FW1 de la V_H
21	aa de la CDR2 de la V_L del clon 3E.1	37	aa de la FW2 de la V_H
23	aa de la CDR3 de la V_L del clon 3E.1	38	aa de la FW3 de la V_H
4	aa de la V_L del clon 5H6	39	aa de la FW4 de la V_H
18	aa de la CDR1 de la V_L del clon 5H6	40	aa de línea germinal determinada de la FW1 de la V_L
21	aa de la CDR2 de la V_L del clon 5H6	41	aa de la FW2 de la V_L
26	aa de la CDR3 de la V_L del clon 5H6	42	aa de la FW3 de la V_L
5	aa de la V_L del clon 8A3	43	aa de la FW4 de la V_L
18	aa de la CDR1 de la V_L del clon 8A3	44	aa originales de la FW1 de la V_L
21	aa de la CDR2 de la V_L del clon 8A3	45	región constante de IgG1*
27	aa de la CDR3 de la V_L del clon 8A3	46	región constante de IgG1* - YTE
6	aa de la V_L del clon 4H6	47	nt de la V_L del clon 16
20	aa de la CDR1 de la V_L del clon 4H6	48	se proporcionan diferencias de alotipo de nt de la V_H del clon 16 *
aa consenso de V_L:			
[FW_1] X_1GSX_2SNIGLNYVS [FW_2] RNNQRPS [FW_3] AAWDD$X_3X_4X_5$GEX_6 [FW_4] en la que [FW_1], [FW_2], [FW_3] y [FW_4] representan regiones de entramado de VL, en la que			
(a) X_1 representa residuos de aminoácido arginina (R) o serina (S),			
(b) X_2 representa residuos de aminoácido serina (S) o leucina (L),			
(c) X_3 representa residuos de aminoácido serina (S) o glicina (G),			
(d) X_4 representa residuos de aminoácido leucina (L) o prolina (P),			
(e) X_5 representa residuos de aminoácido arginina (R), isoleucina (I), prolina (P) o serina (S), y			
(f) X_6 representa residuos de aminoácido valina (V) o alanina (A).			
aa consenso de V_H:			
[FW_5] YYYMQ [FW_6] X_7IGSSGGVTNYADSVKG [FW_7] VGLGDAFDI [FW_8] en la que [FW_5], [FW_6], [FW_7] y [FW_8] representan regiones de entramado de VH,			
en la que X_7 representa residuos de aminoácido tirosina (Y), isoleucina (I) o valina (V)			

1.12. Estudios de unión de anticuerpos monoclonales anti-HER3

Se determinaron las constantes de velocidades cinéticas (k_{on}, k_{off}) y de disociación en equilibrio (K_D) para la unión de las IgG anti-HER3 al dominio extracelular de la proteína HER3 humana usando la tecnología de resonancia de plasmón superficial BIAcore™ midiendo la unión del dominio extracelular de HER3 humano (hu HER3(ECD)) a la

IgG capturada sobre una superficie de un chip sensor. Luego se calcularon las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) individuales a partir de las curvas de unión resultantes usando el software BIAevaluation disponible a través del vendedor. Los datos se ajustaron a un modelo de unión 1:1, que incluía un término para corregir la unión limitada por el transporte de masa, en caso de detectarse. A partir de estas constantes de velocidad, la constante de unión de disociación aparente (K_D) para la interacción de IgG con la proteína del dominio extracelular de HER3 humano se calcula entonces a partir del cociente de k_{off}/k_{on}.

A partir de los gráficos de BIAcore de alta resolución, las constantes de velocidad de asociación y disociación para la unión de la IgG parental, el clon 16, al dominio extracelular de HER3 humano fueron de $5,29 \times 10^5$ /Ms y $73,0 \times 10^{-4}$ /s, respectivamente, produciendo una K_D aparente de 14 nM. En comparación, las constantes de velocidad de asociación para la unión de las variantes de IgG mejoradas por afinidad al dominio extracelular de HER3 humano fueron similares a las medidas para la IgG parental, que oscilaban entre $3,41 \times 10^5$ y $4,32 \times 10^5$ /Ms. Estos mismos gráficos también se usaron para determinar las constantes de velocidad de disociación correspondientes para las variantes del clon 16, que oscilaban entre $1,60 \times 10^{-4}$ y $6,21 \times 10^{-4}$ /s. La K_DS aparente para las variantes del clon 16 se calculó tal como se describió anteriormente, y osciló entre 0,429 nM (variante del clon 2C2) y 1,44 nM (variante del clon P2B11). Los errores individuales para k_{on} y k_{off} fueron bajos (≤~2% del parámetro calculado), y los ajustes globales a los datos cinéticos indicaron que el uso del modelo de interacción 1: 1 era apropiado. Además, la evaluación no indicó que la unión estuviera limitada por el transporte de masa.

La tabla 5 resume los atributos biofísicos de los clones monoclonales de combinación proporcionados en la figura 2C, incluyendo los valores de K_{on}, K_{off} y K_D, así como los niveles de expresión y rendimientos.

El anticuerpo monoclonal 2C2, que comprende la VL de 2C2 (SEQ ID NO: 3) y la VH de C16 original (SEQ ID NO: 2) fue el candidato más mejorado por afinidad con una K_D de 0,4 nM, que representa una mejora de 32 veces del anticuerpo monoclonal del clon 16 parental. La mejora de K_D fue principalmente un resultado de una constante de disociación disminuida. Además, se evaluaron el nivel expresión y los rendimientos de producción. Todos los clones del anticuerpo monoclonal se expresaron bien en un estudio de transfección transitoria de 5 días, con el anticuerpo monoclonal 2C2 que mostró el nivel más alto de expresión en este estudio. Todos los candidatos optimizados por afinidad mostraron diferentes extensiones de mejora de afinidad, pero el anticuerpo de 1A4 se retiró debido a una eficiencia de expresión inferior.

Tabla 5: Resumen de las propiedades biofísicas de los diversos candidatos optimizados por afinidad en comparación con el anticuerpo de CL16 (clon 16) parental.

Nombre del clon	pI calculado	Kon (1/Ms) (xE+5)	Koff (1/s) (xE-4)	KD de Biacore (nM, IgG inactiva)	Biacore KD (nM, HER3 inactiva)	Nivel de expresión en el día 5 (transitorio)	Rendimiento (mg/volumen, ml)
P2B11	8,21	4,32	6,21	1,53 (9x)	0,74 (2,4x)	159 ug/ml	70/500
1A4	8,2	3,41	2,86	0,838 (17x)	(3,6x)	60 ug/ml	53/1200
2C2	8,2	3,73	1,60	0,434 (32x)	0,093 (19x)	148 ug/ml	71/600
2F10	8,2	3,54	2,90	0,818 (17x)	0,326 (5x)	130 ug/ml	66/600
3E 1	8,32	3,43	1,78	0,52 (26x)	0,286 (6,2x)	125 ug/ml	59/600
clon 16	7,83	5,29	73,0	14	1,77	ND	ND
Nota: Cada candidato optimizado por afinidad comprende la cadena de la VL del nombre del clon y la VH del C16 original							

Se realizaron diversos ensayos basados en células para evaluar la mejora funcional de los diversos candidatos optimizados por afinidad sobre el clon 16 a través de modelos independientes de ligandos (línea celular de cáncer de mama humano BT-474, n.º de ATCC HTB-20™) así como dependientes de ligando (línea celular de cáncer de mama humano T-47D, n.º de ATCC HTB-133) (ambas líneas celulares obtenidas de ATCC), que incluían la inhibición de la ruta de señalización de HER3 (pHER3 y pAKT), la supresión del crecimiento celular (ensayo de crecimiento a corto plazo de 6 días y ensayo clonogénico a largo plazo) y la anulación del pHER3 inducido por HRG en células T-47D (subcepa epitelial diferenciada T-47).

Se realizaron ensayos clonogénicos de la siguiente manera. Se sembraron en placa las células BT-474 a una densidad de 1.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Después de la fijación durante la noche, se trataron las células con IgG de control de isotipo o los anticuerpos monoclonales contra HER3 indicados siguiendo una curva de concentración-dosis. El medio con las dosis adecuadas de anticuerpos monoclonales se recargó una vez por semana durante tres semanas. Al final del día 21, se procesaron las células para el ensayo Celltiter-Glo (CTG) para evaluar la inhibición de la formación de colonias por los diversos anticuerpos monoclonales (usando IgG de control como referencia). Se derivaron los valores de CI_{50} del análisis de Prizm.

Se realizó el ensayo de crecimiento de 6 días de BT-474 esencialmente tal como se usó para la figura 4 (véase la sección 2.2 en el ejemplo 2, a continuación). Se realizó el ensayo de BT-474 pAKT esencialmente tal como se usó para la figura 10 (véase la sección 2.6.1 en el ejemplo 2, a continuación). Se realizó el ensayo de pHER3 inducible por HRG de T-47D esencialmente tal como se usó para la figura 3 (véase la sección 2.1 en el ejemplo 2, a continuación), y se realizó el ensayo de unión e internalización FACS de T-47D usando el mismo protocolo utilizado para la figura 16A (véase la sección 3.3.1 en el ejemplo 3, a continuación).

Se compilaron los valores de CI_{50} y los niveles máximos de inhibición con fines de comparación. Tal como se muestra en la tabla 6**,** los candidatos mejorados por afinidad mostraron una potencia aumentada en 2-3 veces consistente con la mayoría de los ensayos. El clon 16 parental y/o un clon optimizado representativo, por ejemplo, el anticuerpo del clon 2C2 (también denominado simplemente 2C2 o anticuerpo monoclonal 2C2) se caracterizaron adicionalmente en varios ensayos *in vitro* e *in vivo* tal como se describe a continuación.

Además, se introdujeron mutaciones en la región Fc del clon 2C2 optimizado para extender la semivida. De manera específica, M252Y, S254T, T256E, numerados según el índice UE como en Kabat. Esta molécula optimizada por la semivida se conoce como 2C2-YTE. Se entenderá que pueden introducirse otras mutaciones en lugar de, o en combinación con, estas tres, véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.083.784; la publicación de solicitud internacional n.º WO2009058492; Dall'Acqua *et al.*, 2002 J. Immunol. 169:5171-80; Zalevsky *et al.*, 2010, Nature Biotech. 28:157-9). Se demostró que 2C2-YTE inhibe la proliferación de células BT-474 y el crecimiento de colonias en la misma medida que 2C2 (datos no mostrados).

Se obtuvo una composición refrigerante (2-8ºC) formulando los anticuerpos (por ejemplo, 50 mg/ml) en histidina/HCl de histidina 25 mM, sacarosa 205 mM, polisorbato 80 al 0,02% a pH 6,0.

Tabla 6: Resumen de las propiedades biológicas de los candidatos optimizados por afinidad en comparación con el anticuerpo monoclonal de CL16 parental.

	Ensayo clonogénico de BT474		Crecimiento de 6 días de BT474		Ensayo de pAKT de BT474		pHer3 inducible por HRG de T47D		Unión de FACS de T47D	
Nombre del clon	CI50 (pM)	% de inhibición máxima	Punto de inflexión (pM)	% de inhibición máxima	Punto de inflexión (pM)	% de inhibición máxima	CI50 (pM)	% de inhibición máxima	Kd (pM)	GMFI máxima
P2B11	26,9	87,1	98	47,5	23,6	62	79,8	85	199	1441
1A4	30,7	81,3	133,3	54,5	28,5	62	133	84	281	1577
2C2	31,9	87,2	62,7	48,3	42,6	61	130,3	85	316	1583
2F10	31,2	80,4	66,7	49	46,4	62	127,2	86	306	1527
3E 1	20,8	79,2	85,3	48,1	26,2	66	59,2	86	447	1644
clon 16-PA	64,5	79,8	280	46	73,1	64	104,4	75	112	1055

Ejemplo 2. Caracterización de anticuerpos monoclonales anti-HER3

2.1. Ensayo de fosforilación de HER3 (pHER3) inducida por HRG en células MCF-7

MCF-7 (n.º de ATCC HTB-22™) es una línea celular de cáncer de mama humano con expresión de HER3 pero sin expresión endógena de HRG. Se sembraron en placa las células MCF-7 a una densidad de 30.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se les permitió fijarse durante la noche. Luego las células fueron privadas de suero durante 24 horas antes del tratamiento. Después de la privación de suero, se eliminaron los medios y se reemplazaron con medios sin suero que contenían anticuerpos de prueba y control, y se incubaron las células a 37ºC durante 1 hora. Los anticuerpos de prueba usados en este ejemplo, y en los ejemplos adicionales proporcionados a continuación, incluyen los anticuerpos anti-HER3 proporcionados en el presente documento tales como, clon 16, 2C2, 2C2-YTE; y anticuerpos anti-HER3 conocidos en la técnica, en particular U1-59 (publicación de patente internacional WO 2007077028) y Ac n.º 6 (publicación de patente WO 2008/100624) designados aquí como AMG y MM, respectivamente. Mientras tanto, se preparó la reserva de herregulina (HRGβ1, R&D Systems, Mineápolis, MN) a 4x (80 ng/ml) en medio de crecimiento sin suero. Al final del periodoperiodo de incubación de 1 hora, se hicieron adiciones conocidas de HRGβ1 en los pocillos (concentración final de 20 ng/ml) y se incubó a 37ºC durante 20 minutos. Al final del tratamiento, se retiraron los medios y se lavaron las células con PBS. Se lisaron las células en 80 µl de tampón de lisis Triton X (Boston Bioproducts, Ashland, MA) con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Calbiochem, La Jolla, CA) y se almacenaron a -20ºC hasta el análisis. Luego se realizó el ELISA de

pHER3 siguiendo el protocolo del fabricante (R&D Systems, DYC1769) usando placas de ELISA Corning® Costar® 3690 de 96 pocillos de medio volumen (Corning Life Science, Lowell, MA) y 50 μl de lisado celular por pocillo.

La activación de HER3, reflejada por la fosforilación de HER3 (abreviada como pHER3), se estimuló mediante el tratamiento celular con HRGβ1. El tratamiento previo con Acm 2C2 anti-HER3 provocó una supresión dependiente de la dosis de la señal de pHER3 en el ensayo ELISA de pHER3 (figura 3, parte superior). Los anticuerpos monoclonales anti-HER3 publicados MM y AMG también fueron activos en este ensayo, sin embargo, 2C2 fue aproximadamente 5 veces más potente según lo determinado mediante mediciones de CI_{50} (figura 3, parte inferior). Se observaron resultados similares para 2C2-YTE (datos no mostrados).

2.2. Supresión del crecimiento de células de cáncer de mama MDA-MB-175

MDA-MB-175 (n.º de ATCC HTB-25™) es una línea celular de cáncer de mama que expresa HRG (isoforma γ) establecida que depende de la ruta de señalización de HRG-HER3 para el crecimiento y la supervivencia. Se sembraron en placa las células a una densidad de 2.000 células/pocillo en una placa de paredes blancas de 96 pocillos y se les permitió fijarse durante la noche. Al día siguiente, se retiraron los medios y se reemplazaron con 100 μl/pocillo de medio de crecimiento completo recién preparado que contenía anticuerpos de prueba y control. Se incubaron las placas durante un total de 6 días. Para calcular el número relativo de células, se utilizó CellTiter-Glo ™ (Promega, Madison, WI) según el protocolo del fabricante. Después de la adición de CellTiter-Glo™, se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 10 minutos y se midió la luminiscencia usando un lector de microplacas.

Se llevó a cabo el ensayo de crecimiento con anticuerpos monoclonales anti-HER3 2C2, MM o AMG. Tal como se muestra en la figura 4, los tres anticuerpos lograron un efecto de antiproliferación en diversas extensiones, mostrando 2C2 la mayor potencia (CI_{50}=0,14 μg/ml) (figura 4, parte superior) y la mayor supresión del crecimiento (72%) (figura 4, parte inferior).

2.3. Supresión del crecimiento de células de melanoma HMCB

HMCB (n.º de ATCC CRL-9607™) es un modelo establecido de melanoma que expresa HRG (isoforma 1β) dirigido por la heterodimerización de HER2-HER3 inducida por HRG. Se sembraron en placa las células HMCB a una densidad de 750 por pocillo en 100 μl de medio completo que contenía FBS inactivado por calor al 10% en placas de 96 pocillos (Costar®). Al día siguiente, se prepararon tratamientos con anticuerpos en medio completo. La concentración inicial para todos los anticuerpos monoclonales anti-HER3 y la IgG de control fue de 10 μg/ml, y se prepararon las diluciones en serie en medio completo. Se retiró el medio de preparación de placas y se añadieron los tratamientos en 100 μl por pocillo por triplicado.

Luego se incubaron las placas en el 5% de CO_2 a 37ºC durante 6 días. Se añadieron volúmenes iguales del reactivo CellTiter-Glo™ a cada pocillo. Se agitaron las placas en un agitador de placas durante 10 minutos a temperatura ambiente para asegurar la lisis celular completa. Se midió la luminiscencia usando un lector 2104 EnVision® Multilabel (PerkinElmer, Waltham, MA).

Tal como se muestra en la figura 5, 2C2 fue de nuevo más potente que los anticuerpos existentes. 2C2 fue de 8-30 veces más potente que los anticuerpos monoclonales anti-HER3 AMG y MM publicados en la inhibición del crecimiento celular de la línea celular de melanoma HMCB.

2.4. Ensayos de actividad de HER3 y AKT en células de melanoma HMCB y células de NSCLC A549

Se evaluó la capacidad de HER3 que conduce a la supresión de la ruta de señalización de HER3 en los modelos HMCB (n.º de ATCC CRL-9607™) y A549 (n.º de ATCC CCL-185) autocrinos por HRG. Se sembraron en placa las células HMCB a 10^5 por pocillo en placas de 24 pocillos y en medio que contenía FBS inactivado por calor al 10%, y se dejó alcanzar una confluencia del 80% o más antes del tratamiento con anticuerpos. Se retiró el medio de preparación de placas y se sometieron las células a incubación con los anticuerpos. Se prepararon los anticuerpos monoclonales anti-HER3 y una IgG de control en medio completo. La concentración inicial para todos los anticuerpos anti-HER3 fue de 10 μg/ml y se realizaron diluciones en serie. Sólo se usó la IgG de control a una concentración de 10 μg/ml. Se aplicaron los tratamientos después de la eliminación del medio de preparación de placas. Después de una incubación de 6 horas (células HMCB) o 72 horas (células A549) en el 5% de CO_2 a 37ºC, se lavaron las células una vez con PBS enfriado con hielo y luego se lisaron añadiendo tampón reductor Laemmli (Boston BioProducts, Ashland, MA).

Después de una breve incubación, se recolectaron los lisados celulares, se cargaron cantidades iguales en geles Bis NuPAGE® Novex® Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transfirieron las proteínas a las membranas de PVDF (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se bloquearon las membranas con leche desnatada en polvo al 5% y Tween 20 al 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) en TBS (pH 7,4) y se incubaron durante la noche a 4ºC con anticuerpos contra HER3 (anticuerpo sc-285, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), pHER3 (anticuerpo 4791, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), AKT (anticuerpo 9272, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), pAKT (anticuerpo 4060, Cell Signaling

Technology, Beverly, MA), anticuerpo neurregulina 1/HRG (NRG1/HRG) (sc-348, Santa Cruz) y GAPDH (anticuerpo G8795, Sigma, St. Louis, MO).

Se lavaron las membranas en Tween 20 al 0,1% en TBS y luego se incubaron durante 1 hora en anticuerpos secundarios de estreptavidina conjugados con peroxidasa de rábano (GE Healthcare). Después del lavado, se detectaron bandas de proteínas en una película de rayos X usando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal® West Femto y el sustrato quimioluminiscente SuperSignal® West Pico (Pierce/Thermo Scientific, Rockford, IL).

Tal como se muestra en las figuras 6 y 7, el anticuerpo 2C2 anuló la ruta de señalización de HER3 tanto en las células HMCB como en las A549. 2C2 suprimió de manera eficaz el pHER3 y su pAKT de molécula efectora en el sentido de 3' de una manera dependiente de la dosis y fue más potente que cualquiera de los anticuerpos monoclonales anti-HER3 publicados AMG o MM en las células HMCB. El anticuerpo 2C2 también suprimió el pHER3 y su pAKT de molécula efectora en el sentido de 3' en las células A549.

2.5. Ensayo para la fosforilación de HER3 (pHER3) en modelos celulares para cáncer de pulmón, gástrico y de mama

2.5.1. Ensayo celular de pHER3

Se sembraron en placas las células (células de NSCLC HCC827, células de NSCLC HCC827 resistentes a gefitinib, células cancerosas gástricas MKN45, células cancerosas gástricas Kato III o células cancerosas de mama amplificadas por HER2 BT-474) a una densidad de 30.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se les permitió fijarse durante la noche. Luego se trataron las células con anticuerpos de prueba o control en la curva de dosis indicada a 37ºC durante 4 horas. Al final del tratamiento, se retiraron los medios y se lavaron las células con PBS. Se lisaron las células en 80 μl de tampón de lisis Triton X (Boston BioProducts, Ashland, MA) con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Calbiochem, La Jolla, CA) y se almacenaron a -20ºC hasta el análisis. Luego se realizó el ELISA de pHER3 siguiendo el protocolo del fabricante (R&D Systems, DYC1769, Mineápolis, MN) usando placas de ELISA de 96 pocillos de medio volumen (Costar 3690) y 50 μl de lisado celular por pocillo.

2.5.2. Supresión de la actividad de pHER3 en células HCC827

Se trataron células HCC827 (ATCC CRL-2868™), un modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) dirigido por EGFR mutante, con anticuerpos de prueba o control tal como se describe anteriormente en la sección 2.5.1 del ejemplo (véase anteriormente). Tal como se muestra en la figura 8A, el anticuerpo 2C2 pudo inhibir de manera parcial la señal de pHER3, mientras que los anticuerpos monoclonales anti-HER3 publicados AMG y MM fueron menos efectivos y 10 veces menos potentes que 2C2.

2.5.3. Supresión de la actividad de pHER3 en células HCC827 resistentes a gefitinib

HCC827 alberga y es dirigido por el EGFR mutante, lo que lo hace altamente sensible a los inhibidores de la tirosina cinasa (TKI) del EGFR tal como el gefitinib. Se expusieron las células HCC827 parentales a una dosis tóxica constante de gefitinib y se aislaron los clones resistentes que mostraron albergar cMET amplificado, un mecanismo conocido para que los cánceres escapen de la terapia con TKI. Se trataron las células HCC827 resistentes a TKI con los anticuerpos monoclonales anti-HER3 tal como se describió anteriormente en la sección 2.5.1 de los ejemplos (véase anteriormente). Tal como se muestra en la figura 8B, el anticuerpo 2C2 monoclonal anti-HER3 suprimió la actividad de HER3 en el HCC827 mutante hecho resistente al gefitinib. Similar a los resultados observados para la línea celular parental, 2C2 mostró una potencia superior que los anticuerpos AMG y MM (potencia aproximadamente 10 veces mejor) en la línea celular HCC827 resistente a TKI.

2.5.4. Supresión de la actividad de pHER3 en células MKN45

Incluso aunque cMET no es miembro de la familia Her, se ha demostrado que puede formar dímeros con HER3. Se usó la línea celular del modelo de cáncer gástrico amplificado por cMET de MKN45 para evaluar si los anticuerpos anti-HER3 pueden antagonizar la activación de HER3 dirigida por cMET. Se trataron las células MKN45 con los anticuerpos monoclonales anti-HER3 tal como se describe anteriormente en la sección 2.5.1 de los ejemplos. Tal como se muestra en la figura 8C, los tres anticuerpos monoclonales anti-HER3 (2C2, AMG y MM) pudieron suprimir el pHER3 en las células MKN45, pero 2C2 mostró una potencia más alta que los anticuerpos AMG y MM (potencia de aproximadamente 5-7 veces mejor).

2.5.5. Supresión de la actividad de pHER3 en células Kato III

Además del acoplamiento con EGFR, HER2 y cMET, HER3 se dimeriza con FGFR2 para facilitar su potencial transformante. Se usó la línea celular Kato III (n.º de ATCC HTB-103™), un modelo de cáncer gástrico amplificado por FGFR2, para evaluar si los anticuerpos anti-HER3 pueden suprimir la activación de HER3 dirigida por FGFR2. Se trataron las células Kato III con los anticuerpos monoclonales anti-HER3 tal como se describió anteriormente en la sección 2.5.1 de los ejemplos (véase anteriormente). En este modelo, los tres anticuerpos monoclonales anti-

HER3 (2C2, AMG y MM) lograron extensiones máximas similares de supresión de pHER3 (~60%), pero tal como se midió mediante CI_{50}, 2C2 fue 15-20 veces más potente que los anticuerpos AMG y MM, respectivamente (figura 8D).

2.5.6. Supresión de la actividad de pHER3 en células BT-474

Los dímeros HER2-HER3 han demostrado ser una de las entidades oncogénicas más transformantes en el cáncer. Por consiguiente, se investigaron los anticuerpos monoclonales anti-HER3 en la línea celular BT-474 (n.º de ATCC HTB-20™), un modelo bien establecido de cáncer de mama amplificado por HER2 que no expresa el ligando y se espera que sea dirigido por la dimerización de HER2-HER3 independiente de ligando. Se trataron las células BT-474 con los tres anticuerpos monoclonales anti-HER3 y también con 2C2-YTE, tal como se describió anteriormente en la sección 2.5.1 de los ejemplos. A diferencia de los modelos en los que los tres anticuerpos monoclonales anti-HER3 sometidos a prueba eran activos, tal como las células HCC827, las células HCC827 resistentes a gefitinib, las células MKN45 y las células Kato III, 2C2 (ambos mutantes 2C2 y 2C2-YTE progenitores) fue el único entre los anticuerpos monoclonales anti-HER3 sometidos a prueba que mostró una actividad sustancial que suprime el pHER3 (figura 8E). Estos resultados indicaron que 2C2 (tanto la forma 2C2 progenitora como el mutante 2C2-YTE) era funcional en un modelo independiente de ligando y demostraba la bifuncionalidad de 2C2 en entornos dependientes de ligando e independientes de ligando.

2.6. Ensayo para la fosforilación de AKT (pAKT) en modelos celulares para cáncer gástrico y de mama

2.6.1. Ensayo celular de pAKT

Se sembraron en placa las células (células de cáncer gástrico MKN45, células de cáncer gástrico Kato III o células de cáncer de mama amplificadas por HER2 BT-474) a una densidad de 30.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se les permitió fijarse durante la noche. Luego se trataron las células con anticuerpos de prueba o control en la curva de dosis indicada a 37ºC durante 4 horas. Al final del tratamiento, se retiraron los medios y se lavaron las células con PBS. Se lisaron las células en 80 µl de tampón de lisis Triton X (Boston BioProducts, Ashland, MA) con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Calbiochem, La Jolla, CA), y se almacenaron a -20ºC hasta el análisis. Se analizaron AKT/pAKT en base al protocolo del fabricante incluido en el kit de lisado de células completas Phospho (Ser473)/Total AKT (n.º de cat. K15100D, Meso-Scale Discovery, Gaithersburg, MD) para determinar el contenido de pAKT.

2.6.2. Supresión de la actividad de pAKT en células MKN45

Para determinar si 2C2 puede suprimir la ruta de señalización en sentido 3' de HER3 además de pHER3, también se evaluó de manera adicional su capacidad para suprimir la fosforilación de AKT en el modelo de cáncer gástrico amplificado dirigido por cMET MKN45. Se trataron las células MKN45 con anticuerpos monoclonales anti-HER3 tal como se describió anteriormente en la sección 2.6.1 de los ejemplos. En este sistema de modelo, el anticuerpo monoclonal 2C2 logró la inhibición parcial de pAKT con mayor potencia (aproximadamente 5-7 veces mayor) que los anticuerpos monoclonales anti-HER3 AMG y MM (figura 9A). Esto demostró que 2C2 no sólo inhibe la actividad de HER3 sino que también suprime las moléculas efectoras en el sentido 3' de HER3, tal como pAKT.

2.6.3. Supresión de la actividad de pAKT en células Kato III

Para investigar si esta actividad se tradujo en una mejor potencia de supresión de pAKT, el efector de HER3, se analizó la inhibición de pAKT por diversos anticuerpos monoclonales anti-HER3 usando en esta línea celular un ensayo de Meso-Scale Discovery tal como se describió anteriormente en la sección 2.6.1 de los ejemplos. Tal como se muestra en la figura 9B, de acuerdo con los datos de pHER3, 2C2 suprimió la pAKT en un modelo de cáncer gástrico amplificado por FGFR2 de células Kato III. 2C2 nuevamente logró una potencia (tal como se midió mediante CI_{50}) y una respuesta máxima mayores en la inhibición de pAKT que los anticuerpos AMG y MM.

2.6.4. Supresión de la actividad de pAKT en células BT-474

Los dímeros HER2-HER3 han demostrado ser una de las entidades oncogénicas más transformantes en el cáncer. Por consiguiente, se investigó la actividad de los anticuerpos monoclonales anti-HER3 en la línea celular BT-474. Se trataron las células BT-474 con los anticuerpos monoclonales anti-HER3 tal como se describió anteriormente en la sección 2.6.1 de los ejemplos, citado anteriormente, y también con la forma mutante YTE 2C2. A diferencia de los modelos en los que los tres anticuerpos monoclonales anti-HER3 sometidos a prueba (2C2, AMG y MM) eran activos, tal como las células MKN45 y Kato III, 2C2 (tanto la forma 2C2 progenitora como el mutante 2C2-YTE) fue el único entre los anticuerpos monoclonales anti-HER3 sometidos a prueba que mostró actividad sustancial supresora de pAKT (figura 9C). Estos resultados indicaron que 2C2 (tanto la forma 2C2 progenitora como el mutante 2C2-YTE) era funcional en un modelo independiente de ligando y demostró la bifuncionalidad de 2C2 (tanto la forma 2C2 progenitora como el mutante 2C2-YTE) tanto en los entornos dependientes de ligando como en los independientes de ligando.

2.7. Supresión de la proliferación celular y señalización de HER3 en células MDA-MB-361.

Para caracterizar la actividad de 2C2-YTE en células de cáncer de mama amplificadas por HER2 que no responden altamente a trastuzumab, se centró en MDA-MB-361 (n.º de ATCC HTB-27), un modelo de cáncer de mama que alberga la mutación activadora en PIK3CA (E545K), que puede contribuir a su resistencia a trastuzumab debido a la activación intrínseca de la ruta de PI3K (Junttila *et al*, 2009, Cancer Cell. 15: 429-40). Se determinaron los efectos de 2C2 sobre la proliferación celular y la señalización de HER3 en este modelo.

Para evaluar la señalización, se sembró en placa la línea celular de mama humana MDA-MB-361 en placas de 24 pocillos a una densidad de 150.000 células por pocillo en RPMI (Invitrogen) complementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 10% (Invitrogen). Al día siguiente, se retiró el medio de preparación de placas y se sometieron las células a incubación con el anticuerpo anti-HER3 2C2 o un anticuerpo de control, en medio completo a una concentración final de 30 μg/ml. Después de una incubación de 6 horas en el 5% de CO_2 a 37ºC, se lavaron las células una vez con PBS enfriado con hielo y luego se lisaron añadiendo tampón reductor Laemmli (Boston BioProducts, Ashland, MA). Después de una breve incubación, se recogieron los lisados celulares, se cargaron cantidades iguales en geles Bis NuPAGE® Novex® Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transfirieron las proteínas a las membranas de PVDF (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se bloquearon las membranas con leche desnatada en polvo al 5% y Tween 20 al 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) en TBS (pH 7,4) y se incubaron durante la noche a 4ºC con anticuerpos contra HER3 (anticuerpo sc-285, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) y pHER3 (anticuerpo 4791, Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Las membranas se lavaron en Tween 20 al 0,1% en TBS y luego se incubaron durante 1 hora en anticuerpos secundarios de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (GE Healthcare). Después del lavado, se detectaron bandas de proteínas en una película de rayos X usando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal® West Femto y el sustrato quimioluminiscente SuperSignal® West Pico (Pierce/Thermo Scientific, Rockford, IL).

Para acceder a la proliferación celular, se sembraron las células MDA-MB-361 a una densidad de 2.000 células en 100 μl de medio que contenía FBS inactivado por calor al 10%; Se usaron placas de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejidos de poliestireno blanco Costar con fondo plano (Corning). Al día siguiente, se retiró el medio de preparación de placas y se añadieron anticuerpos en medio completo hasta un volumen final de 100 μl por pocillo. Luego se incubaron las placas en el 5% de CO_2 a 37ºC durante 6 ó 14 días. Para el ensayo de 14 días, se aplicaron anticuerpos recién preparados en el día 7. Se añadieron volúmenes iguales de reactivo CellTiter-GloR (Promega) a cada pocillo al final de cada punto de tiempo. Se agitaron las placas en un agitador de placas durante 10 minutos a temperatura ambiente para garantizar la lisis celular completa. Se midió la luminiscencia usando un lector EnVision 2104 Multilabel (PerkinElmer).

2C2 redujo los niveles de pHER3 (figura 10A) y suprimió el crecimiento celular (figura 10B) de esta línea celular, lo que sugiere que 2C2-YTE no sólo es activo en cánceres sensibles a trastuzumab con amplificación por HER2, sino que también es activo en cánceres amplificados por HER2 que son menos sensibles a trastuzumab debido a mutaciones en PIK3CA.

2.8. Identificación de tipos de cáncer dependientes de HRG novedosos

Para identificar tipos de cáncer dependientes de HRG novedosos adicionales, se cribaron las líneas celulares de carcinoma de células escamosas de pulmón (SCC) para detectar la actividad de señalización de HER3 y la expresión de HRG. Las líneas celulares HARA-B (n.º de JCRB JCRB1080.1) y KNS-62 (n.º de JCRB IFO50358) expresaron niveles significativos de HER3, HRG y pHER3 (datos no mostrados). Por consiguiente, se investigó la actividad de 2C2 en las líneas celulares HARA-B y KNS-62. Se trataron las células con los anticuerpos monoclonales anti-HER3 esencialmente tal como se describió anteriormente en la sección 2.4 de los ejemplos citada anteriormente, 2C2 pudo reducir los niveles de pHER3 en la línea celular HARA-B (figura 11) y la línea celular KNS-62 (datos no mostrados). Tal como se muestra a continuación (ejemplos, sección 5.4), 2C2-YTE demostró eficacia antitumoral dependiente de la dosis en el modelo de xenoinjerto de NSCLC HARA-B escamoso humano. Por tanto, estos criterios (es decir, la expresión de HER3, HRG así como pHER3) pueden ser herramientas de cribado útiles para identificar tipos de cáncer adicionales que responden a los anticuerpos anti-HER3, incluyendo, por ejemplo, 2C2, AMG, MM tal como se describe en el presente documento y otros conocidos en la técnica (véanse por ejemplo, las publicaciones internacionales de patentes WO2011/136911, WO2012/019024, WO2010/022814).

2.9. HER2 es un iniciador principal en determinados tipos de cáncer dependientes de HRG

En presencia del ligando herregulina (HRG) de HER3, HER3 se heterodimeriza con EGFR o HER2, lo que conduce a la fosforilación de HER3 y la transmisión de una señal oncogénica a través de fosfoinositida 3 cinasa (PI3K) y proteína cinasa B (PKB), también conocida como AKT . Se caracterizó una colección de modelos CRC para determinar qué receptor de tirosina quinasa, EGFR o HER2, es el iniciador principal de la señalización a través de HER3. De manera específica, se trataron seis líneas diferentes de células tumorales CRC, SW620 (n.º de ATCC CCL-227), SW480 (n.º de CCL-228), Colo205 (n.º de CCL-222), LOVO (n.º de CCL-229), HCT15 (n.º de CCL-225) y Caco-2 (n.º de HTB-37), con antagonistas de HER2 o EGFR solos o en combinación con el antagonista 2C2 de HER3. Brevemente, se sembraron las células en placas de 24 pocillos a una densidad de 1,5 x 10^5 células por pocillo. Al día siguiente, se trataron 2 conjuntos idénticos de células con 10 μg/ml de los siguientes anticuerpos:

anticuerpo anti-HER3 2C2, anticuerpo frente a IgG de control R347, anticuerpo anti-HER2 2C4 (por ejemplo, publicación de patente WO2001/00245), el anticuerpo anti-EGFR cetuximab o el inhibidor de tirosina cinasa EGFR gefitinib a 5 μM. Después de 5-6 horas de incubación a 37ºC, se añadió HRG a 50 ng/ml en un conjunto de células durante 15 minutos a 37ºC. Luego se lavaron todas las células con PBS frío y se lisaron mediante la adición de 60 μl de tampón de muestra 2 × SDS (dodecilsulfato de sodio) (Invitrogen). Se transfirieron los lisados a tubos de 1,5 ml y se hirvieron durante 5 minutos, seguido por enfriamiento en hielo durante 2 minutos. Se volvieron a disolver volúmenes iguales (20 μl) de muestras de proteínas en geles NuPAGE Novex Bis-Tris (Invitrogen) antes de transferirlos a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Invitrogen). Se lavaron las membranas en solución salina tamponada con Tris (KPL) que contenía Tween 20 al 0,1% (Sigma) y se incubaron durante la noche a 4ºC con anticuerpos contra HER3 (Santa Cruz Biotechnology), pHER3-Tyr1289 (Cell Signaling Technology), AKT fosforilada (proteína cinasa B (pAKT)) (Cell Signaling Technology), ERK fosforilada (proteína cinasa activada por mitógenos/cinasa regulada por señal extracelular (pERK)) (Cell Signaling Technology) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Sigma). Se lavaron las membranas en solución salina tamponada con Tris (KPL) que contenía Tween 20 al 0,1% (Sigma) y luego se incubaron durante 1 hora en anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (GE HealthCare). Después del lavado, se detectaron bandas de proteínas en una película de rayos X usando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce/Thermo Scientific).

Tal como se observa en la figura 12, los anticuerpos anti-HER3 y anti-HER2 redujeron los niveles de HER3, pHER3 y pAKT en células estimuladas por ligandos, mientras que el antagonista de EGFR tal como el tratamiento con cetuximab y gefitinib no tuvo efecto sobre estas moléculas de señalización. Estos datos demuestran que HER2 es el iniciador principal de la señalización de HER3 inducida por HRG en todos los modelos de cáncer sometidos a prueba.

Ejemplo 3. Mecanismo de estudios de acción para anticuerpos monoclonales anti-HER3

3.1. El clon 16 bloqueó parcialmente la unión de ligandos a HER3

La eficacia de los anticuerpos monoclonales anti-HER3 para bloquear la actividad de HER3 inducida por ligandos puede deberse a su capacidad para bloquear directamente la unión de ligandos. Para investigar este escenario, se estableció un ensayo de unión de HRG-HER3 *in vitro* recubriendo una placa con herregulina (HRG) y uniendo la proteína HER3 recombinante marcada a la misma.

3.1.1. Ensayo de unión de HRG-HER3

Se recubrieron pocillos de microplacas con herregulina 10 ng/ml (HRGβ1, n.º de cat. 377-HB, R&D Systems, Mineápolis, MN) durante la noche a 4ºC. Al día siguiente, se lavaron las placas 4 veces con PBST (PBS + Tween 20 al 0,05%) y se bloquearon en PBS + BSA 1 μg/ml a temperatura ambiente durante 1 hora. Durante el bloqueo, se prepararon diluciones en serie de anticuerpos de prueba (clon 16, AMG, MM y un anticuerpo monoclonal de bloqueo de ligando anti-HER3 de control positivo) en una placa separada en PBSTB (PBS + Tween 20 al 0,05% + BSA al 0,1%) y se combinaron con HER3 recombinante 5 μg/ml (n.º de cat. 348-RB, R&D Systems, Mineápolis, MN) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se lavaron las placas de ELISA 4x con PBST antes de la adición de la mezcla de anticuerpo contra HER3. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavaron posteriormente 4 veces con PBST. Se añadió HRP anti-His (n.º de cat. 34460, Qiagen, Valencia, CA) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas 4 veces con PBST seguido por detección con TMB. Se leyeron las placas a 450 nm usando un lector de microplacas. Los resultados representativos se muestran en la figura 13.

3.1.2. Resultados

Se sometió a prueba la capacidad de varios anticuerpos monoclonales (clon 16, AMG, MM y un anticuerpo monoclonal de bloqueo de ligando anti-HER3 de control positivo) para interferir con la unión de HRG a HER3. El anticuerpo monoclonal de bloqueo de ligando contra HER3 de control positivo, suprimió de manera eficaz y completa la unión de HER3 a HRG. Por el contrario, el clon 16 (el candidato progenitor para 2C2, véase “Optimización de la afinidad” en la sección de ejemplos 1.6 anterior) solo fue parcialmente eficaz para interrumpir esta unión (aproximadamente el 30% de inhibición máxima). Los anticuerpos monoclonales AMG y MM mostraron un efecto de bloqueo parcial débil similar (figura 13) Estos hallazgos mostraron que era poco probable que el clon 16 funcionara como anticuerpo monoclonal de bloqueo de ligando directo.

3.2. El 2C2 altera la dimerización de HER2-HER3

Debido a su naturaleza deficiente en cinasas, el monómero HER3 no está activo y necesita formar heterodímeros con otros RTK para ser activo. Se ha demostrado que el dímero HER2: HER3 es la especie de señalización más oncogénica en entornos dependientes e independientes de ligando (Junttila *et al*, 2009, Cancer Cell. 15: 429-40). Se evaluó la alteración de la dimerización de HER2-HER3 por 2C2 usando un ensayo de formación de dímero HER2-HER3 inducido por HRG en células T-47D, un modelo de cáncer de mama dependiente de ligando que muestra la

formación de dímero HER3-HER2 inducido por HRG, y en células independientes de ligando BT-474. El ensayo se basó en la inmunoprecipitación conjunta de HER3-HER2.

3.2.1. Ensayo de dimerización de HER2-HER3 inducida por ligandos

Se sembraron células T-47D (n.º de cat. de ATCC HTB-133™) a $1x10^6$/pocillo en placas de 6 pocillos durante la noche. A la mañana siguiente, se trataron las células con anticuerpos monoclonales 2C2, CL16, AMG y MM a una concentración de 5 μg/ml en suero completo durante 2 horas a 37ºC. Los controles no incluyeron tratamiento con anticuerpos o tratamiento con la IgG1 R347 de control. El tratamiento fue seguido por 50 ng/ml de tratamiento con HRG durante 10 minutos a 37ºC (incluyendo un control no tratado con HRG). Se lavaron las células 3 veces con PBS frío antes de añadir 500 μl de tampón de lisis celular, que incluía los inhibidores de la proteasa y la fosfatasa (Sigma, St. Louis, MO). Se lisaron las células en hielo durante al menos 30 minutos. Se cosecharon los lisados con un raspador celular. Se añadieron 50 μl de una disolución de perlas de proteína A que contenía 25 μl de perlas de proteína A conjugadas con 1 μg de Acm anti-HER3 (n.º de cat. MAB3481, R&D Systems, Mineápolis, MN) a 500 μl de lisado celular y se transfirieron a columnas de inmunoprecipitación (IP). Se rotaron las columnas de IP durante la noche a 4ºC. Posteriormente, se centrifugaron las columnas de IP para eliminar los lisados, y se lavaron las perlas con tampón de lisis celular frío. Se añadieron 50 μl de tampón de muestra 2X SDS que contenía DTT 50 mM a cada columna de IP, y se hirvieron las columnas durante 4 minutos. Se retiró la punta inferior de cada columna y se centrifugaron las columnas para recoger los eluatos. Se separaron 20 μl de eluato usando SDS-PAGE. Se realizó inmunotransferencia de tipo Western para tanto HER2 como HER3 (con anticuerpo anti-HER2, n.º de cat. OP15L, CalBiochem, La Jolla, CA; y anticuerpo anti-HER3, n.º de cat. SC-285, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

3.2.2. Ensayo de dimerización de HER2-HER3 independiente de ligandos

Se sembraron en placa células BT-474 (n.º de cat. de ATCC HTB-20™) a una densidad de 1 x 10^6 células por pocillo en una placa de 6 pocillos en medio de cultivo celular RPMI 1640 completo con FBS inactivado por calor al 10%. Al día siguiente, se retiró el medio de preparación de placas y se reemplazó con RPMI 1640 completo nuevo que contenía una dosis de saturación de anticuerpos de prueba. En este experimento, CL16, la versión precursora de menor afinidad de 2C2, 2C2 y R347, una IgG de control, se sometieron a prueba a una concentración de 5 μg/ml. Se incubaron las células con anticuerpos durante 2 horas a 37ºC. Luego se retiró el medio y se lavaron las células una vez con PBS frío. Se añadió el 3,3'-ditiobis[propionato de sulfosuccinimidilo] (DTSSP) reticulante a una concentración de 2 mM en 1 ml de PBS frío. Se incubaron las células durante al menos 1 hora en hielo. Luego se lavaron las células 3 veces con PBS frío. Se añadió tampón de lisis celular (500 μl) que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa y se colocaron las células en hielo durante al menos 30 minutos para permitir la lisis antes de cosechar con un raspador celular. Se inmunoprecipitaron HER2 y HER3 de lisados celulares. Se combinaron los lisados celulares (500 μl) con 50 μl de perlas de sefarosa de proteína A (suspensión al 50%; Invitrogen) conjugadas previamente con 1 μg de Acm contra HER3 (MAB3481, R&D Systems) en una columna de centrifugación SigmaPrep (Sigma). Se incubó la mezcla con rotación a 4ºC durante la noche. Al día siguiente, se separaron las perlas del lisado celular mediante centrifugación. Se lavaron las perlas en las columnas cuatro veces con tampón de lisis celular frío (Cell Signaling Technologies) que contenía inhibidores de la proteasa (Sigma) y la fosfatasa (EMD Millipore). Después del procedimiento de lavado, se añadieron 50 μl de tampón de muestra de 2xSDS (dodecilsulfato de sodio) que contenía ditiotreitol 50 mM (DTT; EMD Chemicals) en las columnas de centrifugación. Luego se hirvieron las columnas durante 4 minutos. Se eluyeron las proteínas mediante centrifugación y se usaron inmediatamente para inmunotransferencia (tal como se hizo en la sección 2.4).

3.2.3. Resultados

Se lisaron células T-47D tratadas o no tratadas con HRG. Se precipitó HER3 con anticuerpo monoclonal anti-HER3, luego se volvieron a disolver las proteínas en el sedimento en SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia para determinar la presencia de HER2 como signos de la interacción de HER2-HER3. El modelo era inducible por ligandos ya que el dímero solo se producía tras la estimulación por ligandos. Un tratamiento previo con 2C2 evitó de manera eficaz la formación de dímero, demostrando su capacidad para impedir la formación inducida por ligandos de dímeros HER2-HER3. También se encontró que son eficaces otros anticuerpos monoclonales anti-HER3 incluyendo MM, AMG, y el clon 16 parental, (figura 14A). Cuando se usó el DTSSP reticulante para estabilizar bioquímicamente los complejos de proteínas, se capturó el heterodímero de HER2:HER3 constitutivo en ausencia de HRG en células BT-474, lo que indica una formación de heterodímero independiente de ligandos. El tratamiento previo de células con 2C2 o CL16 alteró de manera eficaz esta formación de heterodímero (figura 14B).

3.3. Internalización y degradación de HER3 inducida por 2C2

La internalización y degradación de la diana son dos mecanismos comunes por los que los anticuerpos monoclonales inhiben sus funciones diana. En primer lugar, se evaluó la internalización de HER3 mediada por 2C2 en las células de cáncer de mama BT-474. A continuación, se determinó si esta rápida internalización de HER3 mediada por 2C2 puede ser seguida por la degradación de la diana.

3.3.1. Ensayo de internalización de HER3

Se determinó la internalización de HER3 usando un ensayo de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se separaron las células BT-474 con la enzima Accutase y se suspendieron las células en PBS que contenía BSA al 1% (tampón de FACS) a una densidad celular de $10x10^6$ células/ml. Se añadieron 50 µl de células a cada célula de una placa de 96 pocillos con fondo en U. Se añadieron 50 µl de anticuerpos monoclonales anti-HER3 más control de isótopos (a 20 µg/ml) en cada pocillo para lograr una concentración final de 10 µg/ml. se incubó la placa a 37ºC durante 0,5 horas, 2 horas y 4,5 horas, respectivamente. Se lavaron las células con tampón de FACS frío dos veces (se sedimentaron las células por centrifugación a 1.500 rpm durante 2 minutos). Se volvieron a suspender las células con tampón de FACS frío que contenía anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano de ratón (n.º de cat. MAB3481, R&D Systems, Mineápolis, MN) a 1 µg/ml o 10 µg/ml.

Se incubaron las células y el anti-HER3 humano en hielo durante 1 hora. Luego se lavaron las células dos veces con tampón de FACS frío. Posteriormente, se volvieron a suspender las células con tampón de FACS frío que contenía un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) (1:200 v/v), y se incubaron en hielo durante 30-45 minutos. Luego se lavaron las células con tampón de FACS frío dos veces y se volvieron a suspender con 100 µl de tampón de FACS frío. En este punto, se realizó FACS. Se obtuvo la media geométrica absoluta de las intensidades de fluorescencia (GMFI) restando el GMFI de los controles que incluyen solo el anticuerpo secundario. Se calculó el aclaramiento relativo de la superficie de HER3 comparándolo con los resultados obtenidos usando un anticuerpo monoclonal de control de IgG. Los resultados representativos se muestran en la figura 15A.

3.3.2. Ensayo de degradación de proteína HER3

Se sembraron células cancerosas de modelos colorrectales Lovo, HCT15 y SW620 (n.os de ATCC CCL-229, CCL-225 y CCL-227, respectivamente) a $1,5x10^5$/pocillo en placas de 24 pocillos. Después de la fijación durante la noche, se trataron las células con 2C2 y el anticuerpo monoclonal de control durante 3-4 horas. Se lavaron las células con PBS frío una vez, se lisaron directamente con 50-60 µl de tampón de muestra 2X SDS y se hirvieron a 100ºC durante 10 minutos. Se cargaron 20 µl de muestras en geles SDS-PAGE, se separaron de manera electroforética y se sometieron a inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpo contra HER3 (Santa Cruz Biotech) para cuantificar los niveles totales de proteína HER3. Los anticuerpos contra GAPDH (Sigma) también se usaron para cuantificar los niveles de GAPDH como un control general de carga de proteínas.

3.3.3. Resultados

Tal como se muestra en la figura 15A, ambas dosis de 2C2 tuvieron un impacto muy similar. Un tratamiento de 30 minutos produjo una pérdida del 39% de la población de HER3 en la superficie (61% restante), mientras que un tratamiento de 2 horas produjo una pérdida del 62% (38% restante), lo que sugiere una internalización de la diana rápida por 2C2. Además, cuando se incubaron los tres modelos diferentes de cáncer colorrectal con 2C2, se observó la degradación de HER3 completa en células SW620, mientras que se observó la degradación casi completa en las otras dos líneas celulares (figura 15B), lo que demuestra que 2C2 era capaz de una fuerte capacidad de degradación de la diana.

3.4. Funciones efectoras: citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA) y citotoxicidad dependiente de complementos (CDC)

La CCDA es una forma reconocida a través de la cual un anticuerpo monoclonal puede conferir su eficacia antitumoral *in vivo.* Para evaluar la actividad de CCDA del clon 16, se usó un ensayo de CCDA *in vitro* habilitado con PBMC en dos modelos de cáncer de mama amplificados por HER2: BT-474 y SkBR3. Se usó Herceptin/tastuzumab como control positivo ya que se ha demostrado que confiere el efecto de CCDA en este tipo de cánceres. En ambos modelos se observaron efectos significativos de destrucción de tumores de Herceptin, pero los restantes anticuerpos monoclonales sometidos a prueba, el clon 16, AMG y MM, estuvieron en gran parte inactivos, lo que indica que carecían de un efecto de CCDA apreciable (datos no mostrados). Se sometió a prueba el 2C2-YTE en ensayos de CDC usando suero humano como fuente de complemento. Además, se incluyeron como controles el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab y el anticuerpo anti-CD20 rituximab. Ninguno de los anticuerpos, incluyendo el 2C2-YTE, mostró ninguna actividad detectable de CDC a ninguna concentración (datos no mostrados). Las células SkBR3 no expresan CD20. Como control positivo, el rituximab demostró una actividad de destrucción celular sustancial en un ensayo de CDC similar contra células Daudi, que expresan CD20 (datos no mostrados).

3.5. Detención del ciclo celular

3.5.1. Ensayo de detención del ciclo celular en células de cáncer de mama SkBR3

Se sembraron en placa células BioSante (n.º de ATCC HTB-30) a una densidad de 150.000 células/pocillo en una placa de 6 pocillos y se permitió que se fijaran durante la noche. Al día siguiente, se retiró el medio y se reemplazó

con medio de crecimiento recién preparado que contenía anticuerpos de prueba y de control. Luego se incubaron las células a 37ºC durante 48 horas. Al final del tratamiento, se tripsinizaron las células, se agruparon en un tubo cónico de 15 ml, y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Luego se lavaron las células una vez con PBS y se fijaron en etanol al 70% helado a -20ºC durante la noche.

Tras la fijación, se centrifugaron las células tal como se describió anteriormente, se lavaron una vez en PBS, y se volvieron a suspender en disolución de tinción (PBS+Triton X-100 al 0,1%, ARNasa A libre de ADNsa 0,2 mg/ml y yoduro de propidio 20 μg/ml). Se tiñeron las células durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y se analizaron usando un sistema de citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences). Se detectó el yoduro de propidio usando el canal rojo de Texas; se analizaron los datos usando el paquete de análisis de citometría de flujo FlowJo (Tree Star, Inc., OR) usando el modelo Dean/Jett/Fox.

3.5.2. Resultados

El análisis del ciclo celular basado en FACS mostró que en células SkBR3, una línea celular de cáncer de mama amplificada por HER2 similar a BT-474, tanto Herceptin como el clon 16 (candidato parental para 2C2) produjeron la detención del ciclo celular en la fase G1 (población de G1 aumentada disminuyendo las poblaciones de S/G2 tal como se muestra en la figura 16).

3.6. Efectos antiangiogénicos bloqueando la secreción de VEGF inducida por HRG

Se ha demostrado que la HRG dirige la secreción de VEGF, una citocina proangiogénica principal, en diversos modelos de cáncer. Por tanto, se evaluaron los efectos inhibidores de 2C2 en la supresión de la secreción de VEGF inducida por HRG en dos modelos de cáncer de mama: MCF-7 y BT-474.

3.6.1. Ensayo de secreción de VEGF inducida por HRG

Se sembraron en placa células MCF-7 y células BT-474 a una densidad de 100.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos, y se dejaron reposar durante 2 días. Luego se retiró el medio y se reemplazó con 500 μl de medio de crecimiento recién preparado que contenía FBS al 2% y anticuerpos de control y prueba. Después de una incubación de 24 horas, se recogió el medio de cultivo celular y se determinaron los niveles de VEGF usando un kit VEGF ELISA (R&D Systems DY293B). Se determinó el número relativo de células en cada pocillo añadiendo medio recién preparado a las células junto con Cell Titer Glo (Promega, razón 1:1) e incubando en placa durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se leyó la luminiscencia usando un lector de placas, y se usaron estos valores para la normalización de los datos.

3.6.2. Resultados

El tratamiento con HRG indujo aumentos drásticos en la secreción de VEGF en BT-474 (figura 17A) y MCF-7 (figura 17B), oscilando ambas líneas celulares de modelos de cáncer de mama entre 6,5 veces y 8 veces. El CL16 (clon 16) y los anticuerpos monoclonales MM pudieron suprimir la mayoría de los aumentos, lo que sugiere que estos anticuerpos monoclonales anti-HER3 pueden conferir efectos de modulación vascular adicionales.

Ejemplo 4. Reactividad cruzada con HER3 de macaco cangrejero y de ratón

4.1. El 2C2 se une a HER3 de macaco cangrejero y de ratón con afinidad similar a la del HER3 humano

Se realizaron ensayos de Biacore esencialmente tal como se describió anteriormente para comparar la afinidad de 2C2 con el HER3 humano, de macaco cangrejero y de ratón para permitir la selección de especies de toxicidad relevante (parte superior de la tabla 7). Se realizaron ensayos adicionales de Biacore para 2C2-YTE usando un instrumento BIAcore de mayor resolución, un reactivo de captura de Fc alternativo y un protocolo de inyección refinado para corregir la unión de fondo. Brevemente, se inmovilizó el reactivo de captura de proteína A en dos células de flujo adyacentes conectadas en serie sobre el mismo chip sensor CM5, usando un protocolo de aminas convencional tal como lo describe el fabricante del instrumento. Una de estas superficies de proteína A se usó como superficie de referencia para este experimento, mientras que la otra sirvió como superficie activa usada para registrar la captura de IgG y la posterior unión de HER3 (ECD). Se registraron las densidades de proteína A finales en las superficies de células de flujo de referencia y activas como RU de 1986 y RU de 1979, respectivamente. Tal como se configuró, el método se configuró de manera que la IgG de 2C2-YTE se capturó primero solo en la superficie activa de la proteína A, seguido por una inyección de una disolución de proteína HER3 sobre las superficies de las células de flujo activas y de referencia. Al hacerlo, esta estrategia corrige la curva de unión para cualquier unión no específica del analito de HER3 a la superficie de captura de proteína A. Para la etapa de captura de IgG, se preparó IgG de 2C2-YTE a 10 nM en HBS-EP + tampón de instrumento (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y P20 al 0,05%), luego se inyectó sobre la superficie de la célula de flujo de proteína A activa durante 30 segundos a una velocidad de flujo de 10 μl/min. Luego se prepararon las proteínas HER3 humana, de macaco y murina inicialmente con disoluciones madre de 500 nM en tampón de instrumento, luego se generaron dos series de diluciones en serie de cada una para proporcionar una concentración final de 0,39 nM. Luego se inyectó la

proteína HER3 sobre las superficies de proteína A de la célula activa y de referencia durante 120 segundos, a una velocidad de flujo de 75 μl/min. Se recogieron los datos de disociación durante 15 minutos, seguidos de dos pulsos de 60 segundos con tampón Gly 10 mM, pH 1,7, entre inyecciones para regenerar las células de flujo de regreso a las superficies de captura de proteína A. Además, se intercalaron varias inyecciones de tampón a lo largo de las series de inyección. Posteriormente, se usaron inyecciones de tampón seleccionadas junto con los datos de la célula de referencia para corregir los conjuntos de datos sin procesar para artefactos de inyección y/o interacciones de unión no específicas, una técnica comúnmente denominada “doble referencia” (Myszka, 1999). Luego se ajustaron los datos de unión completamente corregidos globalmente a un modelo de unión 1:1 (software BIAevaluation 4.1) que incluía un término para corregir la unión limitada por transporte de masas, en el caso de que se detectara. Este análisis determinó las constantes de velocidad cinética (kon, koff), a partir de las cuales luego se calculó la KD aparente como koff/kon (parte inferior de la tabla 7). La variación en los valores de K_{on} y K_{off} entre los dos conjuntos de experimentos es probable que se deba a las diferencias entre los dos protocolos tal como se detalló anteriormente y, por lo general, estaban dentro del intervalo de error de dos veces aceptado para medir estos parámetros cinéticos. Tal como se muestra en la tabla 7, la afinidad de 2C2 y 2C2-YTE para el HER3 de macaco cangrejero era prácticamente idéntica a la del HER3 humano. La afinidad para el HER3 de ratón estaba dentro de tres veces la afinidad para el HER3 humano.

Tabla 7: Ensayo de unión Biacore que muestra la afinidad del 2C2 por HER3 humano, de macaco cangrejero y de ratón.

Captura de IgG	2C2	2C2	2C2
	(ex34c, 34d,43b)	(ex43d)	(exp43f)
Receptor	huHER3 (ECD)-His	muHER3-His	HER3 de macaco cangrejero-His
Formato	captura de IgG (Fc)	captura de IgG (Fc)	captura de IgG (Fc)
K_{on} (1/Ms) ($x10^5$)	4,27 (+/- 0,45)	3,26	4,66
K_{off} (1/s) ($x10^{-4}$)	1,71 (+/- 0,18)	3,78	1,81
K_D (nM)	0,402 (+/- 0,029)	1,16	0,389
Captura de IgG	2C2-YTE	2C2-YTE	2C2-YTE
Receptor	huHER3 (ECD)-His	muHER3-His	HER3 de macaco cangrejero -His
Formato	captura de IgG (Fc)	captura de IgG (Fc)	captura de IgG (Fc)
K_{on} (1/Ms) ($x10^5$)	1,61	1,11	1,52
K_{off} (1/s) ($x10^{-4}$)	0,743	1,91	0,734
K_D (nM)	0,461	1,721	0,483

4.2. Ensayo para determinar la fosforilación inducida por HRG de HER3 de macaco cangrejero

Se transfectaron de manera transitoria células Ad293 (n.º de Stratagene 240085) con el vector de expresión de HER3 de macaco cangrejero de longitud completa siguiendo el protocolo proporcionado con el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se dejaron incubar las células a 37ºC durante 48 horas antes del tratamiento. Se añadieron anticuerpos a 10 μg/ml en medio de crecimiento completo durante 1 hora seguido por estimulación con 20 ng/ml de HRGβ1 (R&D Systems) durante 10 minutos a 37ºC. Al final del tratamiento, se eliminaron los medios y se lavaron las células una vez con PBS. Se lisaron las células con tampón de muestra 2x Tris-glicina Novex (Invitrogen) y se determinaron los niveles de pHER3 y HER3 total mediante inmunotransferencia (anticuerpo de Cell Signaling n.º 4791 y anticuerpo de Santa Cruz n.º 285, respectivamente). La densitometría de las bandas se realizó utilizando el software ImageJ (NIH, imagej.nih.gov/ij/).

4.3. Resultados

Para establecer completamente la unión y la modulación cruzada de HER3 de macaco cangrejero por 2C2, se estableció una línea celular Ad293 estable que expresa ectópicamente HER3 de macaco cangrejero de longitud completa, como lo demuestra la inmunotransferencia de tipo Western (figura 18A). Cuando se trató con HRG, el HER3 de macaco cangrejero experimentó una activación robusta tal como lo demuestra la inducción de la señal de pHER3 (figura 18B). Cuando las células se trataron conjuntamente con 2C2, pero no cuando se trataron con el anticuerpo de control R347, la inducción de pHER3 se anuló completamente, lo que demuestra que 2C2 no solo pudo unirse al HER3 de macaco cangrejero en la superficie celular, sino que también pudo eliminar de manera eficaz su activación (figura 18B). En combinación con los datos de medición de afinidad de Biacore anteriores que muestran que 2C2 presentó una afinidad idéntica al HER3 de macaco cangrejero que al HER3 humano, estos resultados validaron al macaco cangrejero como una especie de toxicidad relevante para los ensayos de 2C2.

Estudios *in vivo* para anticuerpos monoclonales anti-HER3

4.4. Estudios de modelos de xenoinjerto de células de cáncer de cabeza y cuello FADU humano subcutáneo

4.4.1. Método

Se mantuvieron células de cáncer de cabeza y cuello FADU humano (n.º de ATCC HTB-43) a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO_2 en medio RPMI 1640 que contenía 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos inyectando por vía subcutánea 5×10^6 células por ratón (suspendido en Matrigel al 50%) en los costados derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Se permitió que los tumores crecieran hasta 200 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. Se administraron por vía intraperitoneal 2C2, 2C2-YTE, cetuximab, IgG1 de control o la combinación de 2C2 con anticuerpos monoclonales de cetuximab. Para los estudios de dependencia de la dosis, se administró el 2C2 a 3, 5, 7 y 10 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg), el control a 10 mg/kg. Para los estudios de combinación, se administró el 2C2 a 3 mg/kg, cetuximab a 30 mg/kg y el anticuerpo de control a 6 mg/kg. Se usaron las mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor usando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$(longitud × anchura × anchura)

para tumores hechos crecer en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el porcentaje delta de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI), que se calculó de la siguiente manera:

porcentaje delta de TGI = 1 - (dT ÷ dC) × 100,

en la que dT = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de tratamiento en comparación con el valor en la estadificación,

y dC = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de control en comparación con el valor en la estadificación.

Al concluir los estudios de eficacia con 2C2, se trataron los ratones con 2C2 una vez final tal como se indica para determinar los valores farmacocinéticos. Se realizó una punción cardíaca para recoger sangre en los tubos separadores de suero de Microtainer (SST). Se agitaron con vórtex los tubos con sangre suavemente durante 10 segundos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir que el suero coagulara. Se centrifugaron las muestras a 1000 × g durante 10 minutos, y se transfirieron con cuidado las muestras de suero a nuevos tubos y se almacenaron a -80ºC.

Se usó un formato indirecto de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cuantitativa de 2C2 en suero de ratón. Se incubaron los patrones, los controles de calidad y las muestras de suero de ratón con anticuerpos de cabra anti-IgG humana que se inmovilizaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después de la incubación, se eliminaron los materiales no unidos mediante una etapa de lavado y se detectó 2C2 usando un anticuerpo de cabra anti-IgG humana con conjugado de peroxidasa de rábano. Se añadió una disolución ácida de parada y se determinó el grado de renovación enzimática del sustrato midiendo la absorbancia a 450 nm. La absorbancia medida fue directamente proporcional a la concentración de 2C2 presente en el suero de ratón. Se usó una curva patrón de 2C2 para el ensayo para interpolar la concentración de las muestras de suero.

4.4.2. Resultados

Utilizando un modelo de xenoinjerto células de cáncer de cabeza y cuello FADU humano que se hizo crecer por vía subcutánea en ratones hembra desnudos, el 2C2 demostró eficacia antitumoral dependiente de la dosis. Se observó una eficacia máxima al 99% de inhibición del crecimiento del tumor (dTGI) con 7 mg/kg administrados dos veces por semana durante la duración del estudio (figura 19A).

La administración combinada de 3 mg/kg de 2C2 con 30 mg/kg de cetuximab administrado dos veces por semana durante la fase de tratamiento (días 7-18) mostró una clara eficacia antitumoral sinérgica en el modelo de xenoinjerto FADU (figura 19B). Este efecto fue duradero y los tumores solo comenzaron a crecer nuevamente al final de la fase de recrecimiento en el día 40. El tratamiento de combinación produjo 7 de 10 regresiones parciales y 2/10 regresiones completas.

El 2C2 reaccionó de manera cruzada con HER3 de ratón y está bien establecido que HER3 se expresa en muchos tejidos de ratón no enfermos. Por tanto, el HER3 del huésped podría servir como sumidero para absorber el anticuerpo monoclonal 2C2 antes de que llegue al tejido tumoral. Usando ratones desnudos hembra que portaban tumores, se les administró 2C2 a 5 mg/kg a estos ratones o bien una vez o bien tres veces y se siguieron los niveles de exposición de 2C2 a lo largo del tiempo. 2C2 solo fue detectable 1 día después de la última dosis de 5 mg/kg de 2C2 y se volvió indetectable después de 3 días después del último tratamiento (figura 36). Por otro lado, la

administración de dosis con 30 mg/kg de 2C2 usando los mismos programas que para 5 mg/kg condujo a una ventana mucho más prolongada en la que se pudo medir 2C2 en suero de ratón. Estos hallazgos demostraron una farmacocinética no lineal para 2C2 después de una dosis única y la administración de dosis repetidas de 5 mg/kg o 30 mg/kg a ratones que portaban tumores. Los datos mostraron que el HER3 de ratón puede actuar como sumidero para unirse al 2C2 administrado a los ratones y que 30 mg/kg como dosis única fue suficiente para saturar el sumidero.

La existencia de un sumidero de HER3 en ratones para 2C2 se confirmó de manera funcional administrando una dosis de carga alta de 2C2 seguida de una dosis de mantenimiento baja en ratones con tumores de xenoinjerto FADU. La eficacia antitumoral de una dosis de carga de 10 mg/kg y una dosis de mantenimiento de 2 mg/kg de 2C2 se demostró en el modelo tumoral FADU. 10 mg/kg de 2C2 como dosis única solo tuvieron una eficacia antitumoral transitoria. 2C2 administrado a 3 mg/kg dos veces por semana tuvo una eficacia modesta pero continua. La combinación de la dosis de carga de 10 mg/kg con la dosis de mantenimiento de 3 mg/kg de 2C2 fue más eficaz para bloquear el crecimiento del tumor en comparación con cualquier programa de tratamiento solo (figura 21).

Se sometió a prueba la capacidad de 2C2 para modular los marcadores farmacodinámicos pHER3 y pAKT en extractos tumorales de xenoinjerto FADU. Se administró 2C2 dos veces a 30 mg/kg en 48 horas a ratones que portaban tumores de xenoinjerto FADU humanos y se analizaron los extractos 24 horas más tarde. Brevemente, se le implantó a ratones desnudos atímicos por vía subcutánea células de cáncer de cabeza y cuello FADU. A los animales se les administró 2C2 a 30 mg/kg dos veces en 48 horas. Se prepararon los extractos 24 horas después para el análisis de pHER3, pAKT y HER3 total (figura 22, paneles superior, intermedio e inferior, respectivamente). Se usó R347 como anticuerpo frente a IgG1 de control. Hubo 6 animales por grupo de tratamiento. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar. Aquí, 2C2 inhibió la fosforilación tanto de HER3 como de AKT en el 59,5% y el 51,7%, respectivamente, en comparación con los tumores de los ratones tratados con IgG1 de control (figura 22, paneles superior e intermedio). No se observó modulación de HER3 total por 2C2 (figura 22, panel inferior).

4.5. Estudios de modelos de xenoinjerto de células de cáncer de cabeza y cuello Detroit562 humano subcutáneo

4.5.1. Método.

Se mantuvieron células de cáncer de cabeza y cuello Detroit562 humano (n.º de ATCC CCL-138) a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO_2 en medio RPMI 1640 que contenía 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos inyectando por vía subcutánea 5×10^6 células por ratón en los costados derechos de ratones atímicos nu/nu de 4 a 6 semanas de edad. Se permitió que los tumores crecieran hasta 200 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. Se administraron por vía intraperitoneal 2C2, 2C2-YTE, cetuximab, IgG1 de control o la combinación de 2C2 con anticuerpos monoclonales de cetuximab. Para los estudios de dependencia de la dosis, el 2C2 se administró a 1, 3,10 y 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg). Para los estudios de combinación, se administró 2C2 a 3 mg/kg, cetuximab a 30 mg/kg y el anticuerpo de control a 10 mg/kg. Se usaron las mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor usando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$(longitud × anchura × anchura)

para tumores hechos crecer en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el porcentaje delta de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI), que se calculó de la siguiente manera:

porcentaje delta de TGI = 1 - (dT ÷ dC) × 100,

en la que dT = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de tratamiento en comparación con el valor en la estadificación,

y dC = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de control en comparación con el valor en la estadificación.

Al concluir los estudios de eficacia con 2C2, se trataron los ratones con 2C2 una vez final tal como se indica para determinar los valores farmacocinéticos. Se realizó una punción cardíaca para recoger sangre en los tubos separadores de suero de Microtainer (SST). Se agitaron con vórtex los tubos con sangre suavemente durante 10 segundos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir que el suero coagulara. Se centrifugaron las muestras a 1000 × g durante 10 minutos, y se transfirieron con cuidado las muestras de suero a nuevos tubos y se almacenaron a -80ºC.

Se usó un formato indirecto de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cuantitativa de 2C2 en suero de ratón. Se incubaron los patrones, los controles de calidad y las muestras de suero de ratón con anticuerpos de cabra anti-IgG humana que se inmovilizaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después de la incubación, se eliminaron los materiales no unidos mediante una etapa de lavado y se

detectó 2C2 usando un anticuerpo de cabra anti-IgG humana con conjugado de peroxidasa de rábano. Se añadió una disolución ácida de parada y se determinó el grado de renovación enzimática del sustrato midiendo la absorbancia a 450 nm. La absorbancia medida fue directamente proporcional a la concentración de 2C2 presente en el suero de ratón. Se usó una curva patrón de 2C2 para el ensayo para interpolar la concentración de las muestras de suero.

4.5.2. Resultados

El 2C2 mostró eficacia antitumoral en el modelo de xenoinjerto de células de cáncer de cabeza y cuello Detroit562 humano que se hizo crecer por vía subcutánea en ratones hembra desnudos. 10 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue eficaz de manera máxima al 72% de dTGI (figura 23A) El modelo Detroit562 contiene una mutación PIK3CA.

El modelo tumoral Detroit562 fue sensible al anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab que produjo la inhibición del crecimiento del tumor a 10 mg/kg administrados dos veces por semana. La combinación de 3 mg/kg de 2C2 con 10 mg/kg de cetuximab se añadió a la eficacia antitumoral de cetuximab y dio como resultado 9 de 10 regresiones parciales, mientras que cetuximab solo produjo 5/10 regresiones parciales (figura 23B).

4.6. Estudios de modelos de xenoinjerto de células de cáncer de cabeza y cuello CAL27 humano subcutáneo

4.6.1. Método.

Se mantuvieron células de cáncer de cabeza y cuello CAL27 humano (n.º de ATCC CRL-2095) a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO_2 en medio RPMI 1640 que contenía 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos inyectando por vía subcutánea 5×10^6 células por ratón en los costados derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Se permitió que los tumores crecieran hasta 200 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. Se administraron por vía intraperitoneal 2C2-YTE, cetuximab o IgG1 de control. Para los estudios de combinación, se administró 2C2-YTE a 3, 10 y 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg). Se usaron las mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor usando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$(longitud × anchura × anchura)

para tumores hechos crecer en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el porcentaje delta de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI), que se calculó de la siguiente manera:

porcentaje delta de TGI = 1 - (dT ÷ dC) × 100,

en la que dT = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de tratamiento en comparación con el valor en la estadificación,

y dC = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de control en comparación con el valor en la estadificación.

4.6.2. Resultados.

La actividad dependiente de la dosis de 2C2-YTE se confirmó en un tercer modelo de tumor de cabeza y cuello, CAL27, usando 2C2-YTE. El 2C2-YTE a 3, 10 o 30 mg/kg administrado dos veces por semana mostró TGI con el 26,4%, el 55,2% o el 68,8%, respectivamente, en comparación con los animales tratados con IgG1 de control (figura 24).

El modelo de tumor CAL27 fue sensible al anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab que produjo la inhibición del crecimiento del tumor a 30 mg/kg administrados dos veces por semana con un TGI del 75.0%.

4.7. Estudios de modelos de xenoinjerto de células de NSCLC A459 con KRAS mutado humano subcutáneo

4.7.1. Método

Se mantuvieron células de NSCLC A549 humano (n.º de ATCC CCL-185) que contenían una mutación en el codón 12 del gen KRAS a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO_2 en medio F12K de HAM que contenía 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos inyectando por vía subcutánea 5×10^6 células por ratón (suspendidas en Matrigel al 50%) en los costados derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Se permitió que los tumores crecieran hasta 200 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. Se administraron por vía intraperitoneal 2C2, 2C2-YTE, cetuximab, IgG1 de control o la combinación de 2C2 con anticuerpos monoclonales cetuximab. Para los estudios de combinación, se administró 2C2 a 3, 10 y 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg) y 2C2-YTE a 10 mg/kg. Para los estudios de

combinación se administraron cada uno de 2C2 y cetuximab a 10 mg/kg. Se usaron las mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor usando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$(longitud × anchura × anchura)

para tumores hechos crecer en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el porcentaje delta de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI), que se calculó de la siguiente manera:

porcentaje delta de TGI = 1 - (dT ÷ dC) × 100,

en la que dT = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de tratamiento en comparación con el valor en la estadificación,

y dC = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de control en comparación con el valor en la estadificación.

4.7.2. Resultados.

El 2C2 demostró eficacia antitumoral dependiente de la dosis en el modelo de xenoinjerto de células de NSCLC A549 humano que se hizo crecer por vía subcutánea en ratones hembra desnudos. La eficacia máxima del 91% de dTGI se logró con 30 mg/kg de 2C2 administrados dos veces por semana hasta el día 33 (figura 25A). 2C2 y 2C2-YTE administrados a 10 mg/kg mostraron una eficacia antitumoral similar en este modelo de tumor A549. Una vez que se detuvo el tratamiento, los tumores comenzaron a crecer a la misma velocidad que los tumores en ratones tratados con control. El modelo de xenoinjerto A549 contiene una mutación de KRAS y una deleción de LKB-1.

Cetuximab a 10 mg/kg solo no fue eficaz en este modelo de tumor A549. Sin embargo, la adición de cetuximab a 10 mg/kg a 2C2 también a 10 mg/kg dio como resultado una eficacia antitumoral aditiva durante la fase de tratamiento en comparación con 2C2 solo. Además, el grupo de tratamiento combinado mostró una tasa de recrecimiento más lenta de los tumores después de la interrupción del tratamiento (figura 25B).

4.8. Estudios de modelos de xenoinjerto de células de NSCLC escamoso HARA-B humano subcutáneo

4.8.1. Método

Se mantuvieron células de NSCLC escamoso HARA-B humano que expresan el gen RAS de tipo natural, HRG y pHER3 a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO_2 en medio RPMI 1640 que contenía 4,5 g/l de glucosa, 2,383 g/l de tampón HEPES, L-glutamina, 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, 110 mg/l de piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos inyectando por vía subcutánea 5×10^6 células por ratón (suspendidas en Matrigel al 50%) en los costados derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Se permitió que los tumores crecieran hasta 227 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. Se administraron por vía intraperitoneal 2C2-YTE a 3, 10 y 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg), el control fue 30 mg/kg. Se usaron las mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor usando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$(longitud × anchura × anchura)

para tumores hechos crecer en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el porcentaje delta de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI), que se calculó de la siguiente manera:

porcentaje delta de TGI = 1 - (dT ÷ dC) × 100,

en la que dT = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de tratamiento en comparación con el valor en la estadificación,

y dC = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de control en comparación con el valor en la estadificación.

4.8.2. Resultados

El 2C2-YTE demostró la eficacia antitumoral dependiente de la dosis en el modelo de xenoinjerto de células de NSCLC escamoso HARA-B humano que se hizo crecer por vía subcutánea en ratones hembra desnudos. La eficacia máxima del 64,6% de dTGI se logró con 30 mg/kg de 2C2-YTE administrados dos veces por semana hasta el día 29 (figura 26) 2C2-YTE administrado a 10 mg/kg mostró una eficacia antitumoral similar a 30 mg/kg; sin embargo, 2C2-YTE a 3 mg/kg no fue eficaz en este modelo de tumor HARA-B. El modelo de xenoinjerto HARA-B contiene un alelo RAS de tipo natural.

4.9. Estudios de modelos de xenoinjerto de células de CRC HT-29 humano subcutáneo

4.9.1. Método

Se mantuvieron células de carcinoma colorrectal HT-29 humano (n.º de ATCC HTB-38) a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO_2 en medio RPMI 1640 que contenía 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos inyectando por vía subcutánea 5×10^6 células por ratón en los costados derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Se permitió que los tumores crecieran hasta 200 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. Se administraron por vía intraperitoneal anticuerpos monoclonales 2C2, 2C2-YTE e IgG1 de control. Se administró 2C2 a 2, 10 y 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg), mientras que 2C2-YTE fue a 30 mg/kg. Se usaron las mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor usando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$(longitud × anchura × anchura)

para tumores hechos crecer en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el porcentaje delta de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI), que se calculó de la siguiente manera:

porcentaje delta de TGI = 1 - (dT ÷ dC) × 100,

en la que dT = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de tratamiento en comparación con el valor en la estadificación,

y dC = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de control en comparación con el valor en la estadificación.

4.9.2. Resultados

El 2C2 mostró eficacia antitumoral dependiente de la dosis utilizando el modelo de xenoinjerto colorrectal humano HT-29 inyectado por vía subcutánea en ratones hembra desnudos. 30 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue eficaz al 56% de dTGI durante la fase de tratamiento (figura 27). 2C2-YTE mostró la misma eficacia que 2C2, ambos administrados a 30 mg/kg. Una vez que se detuvo el tratamiento, los tumores crecieron a la misma velocidad que los tumores de control. El modelo de xenoinjerto HT-29 contiene una mutación de BRAF. Cetuximab a 10 mg/kg solo no tenía actividad antitumoral medible en este modelo. La actividad de 2C2 30 mg/kg en combinación con cetuximab a 10 mg/kg fue indistinguible de la actividad de 2C2 30 mg/kg solo al final de la fase de tratamiento (datos no mostrados). Esto indica que este modelo de tumor CRC que expresa EGFR, que responde bien a 2C2, no se inhibió adicionalmente por la adición de 2C2-YTE al cetuximab.

4.10. Estudios de modelos de xenoinjerto de células de CRC HCT-116 humano subcutáneo

4.10.1. Método

Se mantuvieron células de carcinoma colorrectal HCT-116 humano a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO_2 en medio RPMI 1640 que contenía 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos inyectando por vía subcutánea 5×10^6 células por ratón en los costados derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Se permitió que los tumores crecieran hasta 200 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. Se administraron por vía intraperitoneal anticuerpos monoclonales 2C2, 2C2-YTE, cetuximab e IgG1 de control. Se administró 2C2 a 3, 10 y 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg) mientras que 2C2-YTE fue a 30 mg/kg. Se usaron las mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor usando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$(longitud × anchura × anchura)

para tumores hechos crecer en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el porcentaje delta de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI), que se calculó de la siguiente manera:

porcentaje delta de TGI = 1 - (dT ÷ dC) × 100,

en la que dT = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de tratamiento en comparación con el valor en la estadificación,

y dC = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de control en comparación con el valor en la estadificación.

4.10.2. Resultados

El 2C2 a varias concentraciones diferentes y 2C2-YTE a 10 mg/kg administrados dos veces por semana mostraron

una eficacia antitumoral modesta en el modelo de xenoinjerto de células de carcinoma colorrectal HCT-116 humano inyectado por vía subcutánea en ratones hembra desnudos (figura 28). La eficacia máxima se observó al 43% de dTGI para 2C2 a 10 mg/kg. El anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab no tuvo eficacia a 10 mg/kg. El modelo de xenoinjerto HCT-116 contiene una mutación de KRAS.

4.11. Estudios de modelos de xenoinjerto de células de CRC LOVO humano subcutáneo

4.11.1. Método

Se mantuvieron células de carcinoma colorrectal humano LOVO (n.º de ATCC CCL-229) a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO_2 en medio F12K de HAM que contenía 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos inyectando por vía subcutánea 5×10^6 células por ratón en los costados derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Se permitió que los tumores crecieran hasta 200 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. Se administraron por vía intraperitoneal anticuerpos monoclonales 2C2, 2C2-YTE, cetuximab e IgG1 de control. Se administró 2C2 a 10 ó 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg), se administraron 2C2-YTE y cetuximab a 10 mg/kg y el control a 30 mg/kg. Se usaron las mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor usando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$(longitud × anchura × anchura)

para tumores hechos crecer en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el porcentaje delta de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI), que se calculó de la siguiente manera:

porcentaje delta de TGI = 1 - (dT ÷ dC) × 100,

en la que dT = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de tratamiento en comparación con el valor en la estadificación,

y dC = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de control en comparación con el valor en la estadificación.

4.11.2. Resultados

2C2 a 30 mg/kg administrado dos veces por semana logró una eficacia antitumoral del 48% de dTGI en el modelo de xenoinjerto colorrectal humano LOVO que se hizo crecer por vía subcutánea en ratones hembra desnudos (figura 29). 2C2, 2C2-YTE y cetuximab, todos a 10 mg/kg, tuvieron una eficacia comparable. El modelo de xenoinjerto de LOVO contiene una mutación de KRAS.

4.12. Estudios de modelos de xenoinjerto de carcinoma de próstata DU145 humano subcutáneo

4.12.1. Método

Se mantuvieron células de carcinoma de próstata humano DU145 (n.º de ATCC HTB-81) a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO_2 en medio MEM que contenía sales de Earle, 1-glutamina y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos inyectando por vía subcutánea 5×10^6 células por ratón (suspendidas en Matrigel al 50%) en los costados derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Se permitió que los tumores crecieran hasta 200 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. Se administraron por vía intraperitoneal anticuerpos monoclonales 2C2, MM y AMG a 30 mg por kilogramo de peso corporal. Se usaron las mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor usando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$(longitud × anchura × anchura)

para tumores hechos crecer en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el porcentaje delta de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI), que se calculó de la siguiente manera:

porcentaje delta de TGI = 1 - (dT ÷ dC) × 100,

en la que dT = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de tratamiento en comparación con el valor en la estadificación,

y dC = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de control en comparación con el valor en la estadificación.

4.12.2. Resultados

Usando un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata humano DU145 se hizo crecer por vía subcutánea en

ratones desnudos machos, 2C2 a 30 mg/kg administrado dos veces por semana demostró una eficacia antitumoral del 77% de dTGI en este modelo tumoral (figura 30). El modelo de xenoinjerto DU145 contiene una deleción de LKB-1. Los anticuerpos monoclonales anti-HER3 AMG y MM utilizados a 30 mg/kg demostraron eficacia antitumoral, pero fueron menos efectivos que 2C2 a la misma dosis de 30 mg/kg.

4.13. Estudios de modelos de xenoinjerto de células de cáncer de mama BT-474 humano ortotópico

4.13.1. Método

Se mantuvieron células de cáncer de mama humano BT-474 a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO2 en medio RPMI 1640 que contenía 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos ortotópicos inyectando 1×10^7 células por ratón (suspendidas en Matrigel al 50%) en el cuerpo adiposo mamario en el costado derecho de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Se colocaron gránulos de estrógenos (0,36 mg) bajo la piel del costado izquierdo 1-2 días antes de la inyección de las células. Se permitió que los tumores crecieran hasta 200 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. Se administraron por vía intraperitoneal 2C2, 2C2-YTE y/o anti-HER2 anticuerpos conocidos en la técnica: MM, AMG y trastuzumab (nombre comercial Herceptin®; por ejemplo, patente estadounidense n.º 5.821.337) a 30 mg por kilogramo de peso corporal. Se administró lapatinib mediante sonda oral a 100 mg por kilogramo de peso corporal. Se usaron las mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor usando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$(longitud × anchura × anchura)

para tumores hechos crecer en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el porcentaje delta de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI), que se calculó de la siguiente manera:

porcentaje delta de TGI = 1 - (dT ÷ dC) × 100,

en la que dT = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de tratamiento en comparación con el valor en la estadificación,

y dC = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de control en comparación con el valor en la estadificación.

4.13.2. Resultados

Usando un modelo de cáncer de mama humano dirigido por HER2, BT-474, inyectado de manera ortotópica en el cuerpo adiposo mamario de ratones desnudos hembra, la administración de 2C2 a 30 mg/kg inyectado dos veces por semana condujo al 55% de dTGI en xenoinjertos BT-474 (figura 31A). BT-474 expresa HER2 a niveles muy altos de 3+ caracterizados por HercepTest. AMG y MM, ambos administrados a 30 mg/kg, no mostraron eficacia antitumoral en este modelo dirigido por HER2.

El lapatinib es un fármaco de molécula pequeña que inhibe EGFR y HER2. Dado que los tumores BT-474 son dirigidos por HER2, se sometió a prueba lapatinib en este modelo y se encontró que producía estasis tumoral en el modelo tumoral BT-474. El tratamiento de combinación de 30 mg/kg de 2C2 con 100 mg/kg de lapatinib dio como resultado una mejor eficacia antitumoral que lapatinib solo, que fue más claramente visible en un retraso en el recrecimiento de los tumores en ausencia de tratamientos adicionales (figura 31B). La actividad antitumoral de 2C2-YTE fue similar a la de 2C2. El anticuerpo anti-HER2 trastuzumab también se sometió a prueba en este modelo y demostró ser muy activo en este modelo de xenoinjerto dirigido por HER2 con un dTGI del 111,6%. Hubo poca mejora adicional en la actividad de trastuzumab a 30 mg/kg mediante la adición de 30 mg/kg de 2C2, que mostró un dTGI del 118,5% (figura 31C).

La capacidad del clon 16 (el clon parental del que se derivó 2C2) para modular los marcadores farmacodinámicos pHER3 y pAKT se sometió a prueba en extractos de tumor de xenoinjerto BT-474. Brevemente, se implantaron de manera ortotópica ratones desnudos atímicos hembra con células de cáncer de mama BT-474 de alta expresión de HER2. A los animales se les administró el clon 16 a 30 mg/kg dos veces en 48 horas. Se prepararon los extractos 24 horas después para el análisis de pHER3, pAKT y HER3 total (tHER3). Se normalizan los resultados para los animales de control tratados con PBS. Había tres animales por grupo de tratamiento. Tal como se muestra en la figura 32, el clon 16 inhibió la fosforilación tanto de HER3 como de AKT en el 50,0% y el 46,1%, respectivamente, en comparación con los tumores de ratones tratados con PBS, y no se observó modulación del HER3 total por el clon 16.

4.14. Estudios de modelos de xenoinjerto de células cáncer de mama MCF-7 humano ortotópico

4.14.1. Método

Se mantuvieron células de cáncer de mama humano MCF-7 a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO_2 en medio

Optimem que contenía Glutamax, 2,4 g/l de bicarbonato de sodio, Hepes y suero bovino fetal al 5%. Se establecieron los xenoinjertos ortotópicos inyectando 5 × 10^6 células por ratón (suspendidas en Matrigel al 50%) en el cuerpo adiposo mamario en el costado derecho de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Se colocaron gránulos de estrógenos (0,36 mg) bajo la piel del costado izquierdo 1-2 días antes de la inyección de células. Se permitió que los tumores crecieran hasta 200 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. Se administraron por vía intraperitoneal anticuerpos monoclonales 2C2, 2C2-YTE y trastuzumab. Se administró 2C2 a 10 ó 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg), 2C2-YTE y trastuzumab a 10 mg/kg. Se administró paclitaxel por vía intravenosa a 10 mg por kilogramo de peso corporal. Se usaron las mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor usando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$(longitud × anchura × anchura)

para tumores hechos crecer en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el porcentaje delta de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI), que se calculó de la siguiente manera:

porcentaje delta de TGI = 1 - (dT ÷ dC) × 100,

en la que dT = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de tratamiento en comparación con el valor en la estadificación,

y dC = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de control en comparación con el valor en la estadificación.

4.14.2. Resultados

2C2 a 10 mg/kg o 30 mg/kg mostró una eficacia antitumoral moderada del 34% de dTGI en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano MCF-7 inyectado de manera ortotópica en el cuerpo adiposo mamario de ratones hembra desnudos. 2C2-YTE a 10 mg/kg tuvo una eficacia similar a 2C2 a la misma concentración (figura 33A). Trastuzumab no demostró eficacia en este modelo de expresión de HER2, que indicó que HER2 no es suficiente para dirigir el crecimiento del tumor. Los tumores MCF-7 expresaron niveles bajos de HER2 (1+) medidos mediante HercepTest.

El paclitaxel mostró una clara eficacia antitumoral en el modelo de cáncer de mama ortotópico MCF-7 cuando se dosificó a 10 mg/kg cada dos días durante diez días. La adición de 10 mg/kg de 2C2 al tratamiento con paclitaxel aumentó la eficacia antitumoral de paclitaxel solo al final de la fase de tratamiento (figura 33B). Los tumores recrecieron al mismo ritmo que los tumores tratados con paclitaxel después de que se detuviera el tratamiento.

4.15. Estudios de modelos de xenoinjerto de células de cáncer de mama MDA-MB-361 humano ortotópico

4.15.1. Método

Se mantuvieron células de cáncer de mama humano MDA-MB-361 a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO_2 en medio RPMI 1640 que contenía 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos ortotópicos inyectando 5 × 10^6 células por ratón (suspendidas en Matrigel al 50%) en el cuerpo adiposo mamario en el costado derecho de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Se colocaron gránulos de estrógenos (0,36 mg) bajo la piel del costado izquierdo 1-2 días antes de la inyección de células. Se permitió que los tumores crecieran hasta 230 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. Se administraron por vía intraperitoneal 2C2-YTE, y/o anti-HER2 anticuerpos conocidos en la técnica, en particular trastuzumab (nombre comercial Herceptin®; por ejemplo, patente estadounidense n.º 5.821.337) y RhuMAb 2C4 (por ejemplo, publicación de patente WO2001/00245) designados en el presente documento como trastuzumab y 2C4, respectivamente. Se administraron trastuzumab y anticuerpos monoclonales 2C4 por vía intraperitoneal a 30 mg por kilogramo de peso corporal (2C2-YTE) o a 10 mg por kilogramo de peso corporal (trastuzumab y 2C4). Se administró lapatinib mediante sonda oral a 100 mg por kilogramo de peso corporal. Se usaron las mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor usando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$(longitud × anchura × anchura)

para tumores hechos crecer en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el porcentaje delta de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI), que se calculó de la siguiente manera:

porcentaje delta de TGI = 1 - (dT ÷ dC) × 100,

en la que dT = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de tratamiento en comparación con el valor en la estadificación,

y dC = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de control en comparación con el valor en la

estadificación.

4.15.2. Resultados

Usando un modelo de cáncer de mama humano dirigido por HER2, MDA-MB-361 (prueba de Hercept +2), inyectado de manera ortotópica en el cuerpo adiposo mamario de ratones hembra desnudos, la administración de 2C2-YTE a 30 mg/kg inyectado dos veces por semana durante cinco dosis condujo al 70,1% de dTGI en xenoinjertos MDA-MB-361 (figura 34A-C). Las células MDA-MB-361 expresan HER2 a niveles medios de 2+ caracterizados mediante HercepTest y obtienen una puntuación positiva mediante el análisis FISH (análisis de hibridación fluorescente *in situ*). Trastuzumab y rhuMAb 2C4, ambos administrados a 10 mg/kg, y lapatinib a 100 mg/kg administrados dos veces al día también mostraron eficacia antitumoral en el modelo tumoral MDA-MB-361.

Dado que los tumores MDA-MB-361 son dirigidos por HER2, se combinó 2C2-YTE con fármacos que seleccionan como diana HER2 como trastuzumab, rhuMAb 2C4 o lapatinib. El tratamiento de combinación de 30 mg/kg de 2C2-YTE con 10 mg/kg de trastuzumab dio como resultado una eficacia antitumoral aditiva en comparación con trastuzumab solo. Además se observó un efecto aditivo en un retraso en el recrecimiento de los tumores en ausencia de tratamientos adicionales (figura 34A). La combinación de 2C2-YTE con trastuzumab fue mejor en comparación con las combinaciones de 2C2-YTE con rhuMAb 2C4 (figura 34B) o lapatinib (figura 34C) en este modelo.

4.16. Ratones transgénicos que expresan receptor FcRn humano para estudiar la exposición de anticuerpos con la modificación YTE.

4.16.1. Método

Los ratones SCID hembra transgénicos que expresan el receptor FcRn humano recibieron una dosis única de 60 mg/kg de clon 16-GL, 2C2 o 2C2-YTE por vía intravenosa. Se recogió el suero de estos ratones en varios puntos de tiempo después de la dosificación por punción cardíaca y se recogió la sangre en tubos Microtainer SST. Se agitaron suavemente los tubos durante 10 segundos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir que el suero coagulara. Se centrifugaron las muestras a 1000 × g durante 10 minutos, y se transfirieron con cuidado las muestras de suero a tubos nuevos y se almacenaron a -80ºC. Se usó un formato indirecto de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cuantitativa de 2C2 en suero de ratón. Se incubaron los patrones, los controles de calidad y las muestras de suero de ratón con anticuerpos de cabra anti-IgG humanos que se inmovilizaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después de la incubación, se eliminaron los materiales no unidos mediante una etapa de lavado y se detectó 2C2 usando una anticuerpo de cabra anti-IgG humana con conjugado de peroxidasa de rábano. Se añadió una solución ácida de parada y se determinó el grado de renovación enzimática del sustrato midiendo la absorbancia a 450 nm. La absorbancia medida fue directamente proporcional a la concentración de 2C2 o 2C2-YTE presente en el suero de ratón. Se usó una curva estándar de 2C2 o 2C2-YTE para el ensayo para interpolar la concentración de las muestras de suero.

4.16.2. Resultados

2C2-YTE, que contiene la mutación YTE en el esqueleto de 2C2, mostró niveles de exposición más altos a lo largo del tiempo en comparación con 2C2 o el clon 16-GL (figura 35). Catorce días después de la dosis única de anticuerpo a estos ratones, el nivel de exposición al suero de 2C2-YTE fue superior a 100 μg/ml, mientras que tanto 2C2 como el clon 16-GL fueron inferiores a 1 μg/ml. Este hallazgo demostró que YTE podría extender la semivida de 2C2-YTE en comparación con su anticuerpo parental 2C2.

4.17. El inhibidor de MEK induce la expresión de HER3 y en combinación con el anticuerpo anti-HER3 muestra eficacia antitumoral aditiva.

Las mutaciones KRAS (oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2) y BRAF (oncogén B1viral de sarcoma murino v-raf) conducen a la activación constitutiva de la señalización de EGFR a través de la ruta oncogénica Ras/Raf/Mek/Erk. La mutación de Kras se encuentra entre los eventos de mutación que se producen de manera más frecuente en muchos tumores sólidos, especialmente el colorrectal (CCR, 30-40%) y el cáncer de pulmón (LC, 20-25%). Además, la mutación de Braf se produce con una frecuencia relativamente alta en CCR (~15%). Debido a su capacidad para activar de manera constitutiva la ruta ERK, se ha demostrado que los Kras y Braf mutantes confieren resistencia tumoral a las terapias RTK, especialmente los Acm contra EGFR como Cetuximab y Panitumumab. Se examinó el efecto de inhibición de la proteína cinasa activada por mitógenos (MEK) en la ruta HER3 en modelos CRC y LC usando el inhibidor de MEK selumetinib (AstraZeneca, véase por ejemplo, WO03/077914 y WO2007/076245) solo o en combinación con 2C2 (o 2C2-YTE). Se examinaron varios modelos CRC y LC, incluyendo los que albergan un mut-Kras (por ejemplo, A549, LOVO) o mut-Braf (por ejemplo, HT-29, Colo205) o un RAS de tipo natural (por ejemplo, HARA-B, KNS-62).

4.17.1. Métodos

Estudios de cultivo celular: se sembraron las células en placa a 10^5 por pocillo en placas de 24 pocillos y en medio que contenía FBS inactivado por calor al 10%, y se dejó alcanzar una confluencia del 80% o más antes del tratamiento. Se prepararon 2C2 (10 μg/ml) o anticuerpo de control, selumetinib inhibidor de MEK (1 ó 10 μM) o una combinación de 2C2 (10 μg/ml) y selumetinib (10 μM) en medio completo. Se aplicaron los tratamientos después de la eliminación del medio de preparación de placas. Después de una incubación de 24 horas en el 5% de CO_2 a 37ºC, se lavaron las células una vez con PBS frío y luego se lisaron añadiendo 60 μL de tampón de muestra de 2x dodecilsulfato de sodio (SDS) (Invitrogen). Se calentaron las muestras durante 5 minutos y luego se enfriaron en hielo durante 2 minutos. Se analizaron las muestras por inmunotransferencia de tipo Western esencialmente tal como se describió anteriormente (véanse los ejemplos, sección 2.4).

Estudios de xenoinjerto: se mantuvieron las células de NSCLC A549 humano (n.º de ATCC CCL-185) que contienen una mutación en el codón 12 del gen KRAS a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO2 en medio F12K de HAM que contenía 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos inyectando por vía subcutánea 5 × 10^6 células por ratón (suspendidas en Matrigel al 50%) en los costados derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Se mantuvieron células de carcinoma colorrectal humano HT-29 (n.º de ATCC HTB-38) a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO_2 en medio RPMI 1640 que contenía 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos inyectando por vía subcutánea 5 × 10^6 células por ratón en los costados derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Se mantuvieron células de carcinoma colorrectal humano LOVO (n.º de ATCC CCL-229) a 37ºC en una incubadora con el 5% de CO2 en medio F12K de HAM que contenía 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Se establecieron los xenoinjertos inyectando por vía subcutánea 5 × 10^6 células por ratón en los costados derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Para los tres modelos tumorales, se permitió que los tumores crecieran hasta 200 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. Se administraron por vía intraperitoneal 2C2-YTE o IgG1 de control. Se administró por vía oral selumetinib. Para los estudios de combinación, se administraron 2C2-YTE y selumetinib a 30 mg/kg o 75 mg/kg, respectivamente. Se usaron las mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor usando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$(longitud × anchura × anchura)

para tumores hechos crecer en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el porcentaje delta de la inhibición del crecimiento del tumor (TGI), que se calculó de la siguiente manera:

porcentaje delta de TGI = 1 - (dT ÷ dC) × 100,

en la que dT = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de tratamiento en comparación con el valor en la estadificación,

y dC = cambio en el volumen del tumor medio en el grupo de control en comparación con el valor en la estadificación.

Preparación de lisados de tumores congelados: los ratones fueron sacrificados de manera humanitaria mediante asfixia con CO_2 de acuerdo con el protocolo *in vivo* y se extirparon los tumores y se transfirieron a tubos de Lysing Matrix A. Se añadió tampón de lisis RIPA (500 μl) que contenía el cóctel inhibidor de proteasa y el conjunto I y II de cóctel inhibidor de fosfatasa, luego se homogeneizaron las muestras usando una máquina Fast Prep. Se enfriaron en hielo las muestras durante 30 minutos y se sometieron a un ciclo de homogeneización adicional antes de la clarificación mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4ºC. Se transfirieron los lisados clarificados a tubos nuevos de 1,5 ml y se midió el contenido de proteínas. Luego se almacenaron los lisados a -80ºC hasta el análisis. Se analizaron las muestras mediante inmunotransferencia de tipo Western esencialmente tal como se describió anteriormente (véanse los ejemplos, sección 2.4).

4.17.2. Resultados

Tal como se muestra en la figura 36, los niveles de proteína pHER3 y total aumentaron después del tratamiento con selumetinib inhibidor de MEK en células de cáncer colorrectal HT-29 cultivadas en cultivo que expresa BRAF mutante y en células LOVO que expresan un KRAS mutante (figura 36, inmunotransferencias izquierda y central, respectivamente). Además, se observó un aumento de HER3 en las células Colo205 que expresan mut-BRAF y en las células DLD-1 y HCT que expresan KRAS mutante (figura 36, inmunotransferencia derecha y datos no mostrados), después del tratamiento con selumetinib. Los aumentos se produjeron en las dosis de selumetinib tanto de 1 μM como de 10 μM. La actividad de selumetinib se confirmó mediante la reducción de pERK en todas las líneas celulares a dosis tanto de 1 μM como de 10 μM. La inhibición de MEK da como resultado una inhibición de la fosforilación de ERK. El anticuerpo anti-HER3, 2C2, inhibió tanto el total como el pHER3 en las células HT-29 y LOVO. 2C2 también redujo HER3 en células Colo205 y DLD-1. Además, el tratamiento conjunto de 2C2 con selumetinib bloqueó la inducción de HER3 y pHER3 totales por selumetinib en células HT-29, LOVO y DLD-1 (figura 36, y datos no mostrados). No se pudo observar HER3 o pHER3 detectable en células de cáncer colorrectal SW480,

que expresan KRAS mutante, ni en células no tratadas ni en tratadas con selumetinib.

Tal como se muestra en la figura 37A, el tratamiento de combinación de 30 mg/kg de 2C2-YTE con 75 mg/kg de selumetinib dio como resultado una eficacia antitumoral aditiva en xenoinjertos de NSCLC A549 en comparación con selumetinib solo. Además, se observó un efecto aditivo en un retraso en el recrecimiento de los tumores en ausencia de tratamientos adicionales (panel superior). El análisis de inmunotransferencia de tipo Western de lisados tumorales de ratones tratados con la combinación de 30 mg/kg de 2C2-YTE con 75 mg/kg de selumetinib durante un periodo de 4 días mostró que fosfo-HER3 y fosfo-ERK estaban completamente inhibidos. Ambos marcadores sirven como lecturas de salida farmacodinámicas para la acción de 2C2-YTE y selumetinib. Se hicieron hallazgos similares con los modelos de xenoinjerto CRC HT-29 (figura 37B, panel superior e inferior) y LoVo (figura 37C, panel superior e inferior). Además, se encontró que fosfo-AKT se redujo en los lisados tumorales HT-29 tratados con la combinación de 30 mg/kg de 2C2-YTE con 75 mg/kg de selumetinib en comparación con los tratamientos individuales (figura 37B, panel inferior). El tratamiento con selumetinib solo a 75 mg/kg conduce a un aumento de fosfo-HER3 en los extractos de tumores LoVo que se impidió en tumores tratados con la combinación de 2C2-YTE y selumetinib (figura 37C, panel inferior). Se observaron resultados similares en HARA-B (datos no mostrados).

En el cultivo celular, se observó que los niveles de proteína HER3 aumentaban en respuesta al inhibidor de MEK en la mayoría de los modelos examinados, lo que indica que la ruta de HER3 puede desempeñar un papel en la resistencia a los inhibidores de MEK. En varios estudios de modelos de xenoinjerto de CRC y LC ortotópico, se observó que la combinación de 2C2-YTE y selumetinib aumenta la eficacia antitumoral de cualquiera de los agentes solos. Estos datos respaldan el uso de 2C2 en combinación con un inhibidor de MEK como selumetinib para mejorar la actividad antitumoral y prevenir la resistencia.

4.18. Estudios toxicológicos en macacos cangrejeros

4.18.1. Método

Se asignaron veinte macacos cangrejeros macho (*Macaca fascicularis*) a cuatro grupos (5 animales por grupo) y se les administraron un total de cinco dosis de control del vehículo o 2C2-YTE a 10, 30 ó 120 mg/kg. Se dosificó a los animales una vez por semana a través de una infusión i.v. de 5 minutos a un volumen de dosis de 5 ml/kg. Se realizó una autopsia a tres animales por grupo el día 32 (tres días después de la administración de la dosis final en el día 29 de la fase de dosificación) y se realizó una autopsia a dos animales por grupo el día 43 de la fase de recuperación (cuarenta y cinco días después de la administración de la dosis final en el día 29 de la fase de dosificación). La evaluación de la toxicidad se basó en varios factores incluyendo la mortalidad, las observaciones clínicas, los pesos corporales, la puntuación de irritación en el sitio de dosis, las evaluaciones de patología clínica y anatómica.

Se aislaron y analizaron las muestras de plasma de macaco cangrejero para determinar los niveles de HER3 soluble (sHER3) usando un formato de tipo sándwich anti-HER3 con un sistema de detección de electroquimioluminiscencia (ECL) para la cuantificación de sHER3 libre. Las placas de 96 pocillos descubiertas Meso Scale Discovery (MSD) (MSD, número de catálogo L15XA-6 / L11XA-6) se recubrieron con 0,5 ug/ml de 2C2-YTE durante la noche a de 2 a 8ºC y posteriormente se bloquearon con MSD Blocker A (MSD, número de catálogo R93BA-1). Los patrones de referencia y los controles de calidad (QC) y las muestras de prueba de plasma de macaco cangrejero sin diluir se añadieron a placas bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo biotinilado anti-hErbB3/HER3 (R&D Systems, número de catálogo BAM348) seguido de la adición de Sulfo-TAG (MSD, número de catálogo R32AD-1) dio como resultado una emisión de luz cuando se estimuló electroquímicamente. Se capturó la señal de ECL y se registró en un dispositivo MSD Sector Imager 2400. La cantidad de luz generada se correlacionó de manera directa con la cantidad de sHER3 en las muestras de plasma de macaco cangrejero. Los datos sin procesar (recuentos de ECL) se exportaron a SOFTmax® PRO. La curva patrón para patrones de HER3 humano recombinante se ajustó usando un programa de ajuste de 5 parámetros. Las concentraciones plasmáticas de HER3 en el macaco cangrejero se calcularon en base a la curva patrón usando la función estadística de SOFTmax PRO.

Además, se recogieron muestras de biopsia de piel para bioanálisis. Brevemente, se dibujaron círculos de 10 mm sobre la piel del animal y se inyectaron por vía intradérmica ~100 µl de PBS o HRG a 0,1 mg/ml en el centro de cada círculo. Aproximadamente 20 minutos después, se recogió una muestra de piel de cada sitio de inyección y se ultracongeló. De manera alternativa, se recogen muestras de biopsia emparejadas (sin inyección intradérmica previa) de cada una y se incuban durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente en medios de cultivo con o sin 100 µg/ml de HRG seguido de dos lavados con PBS enfriado con hielo. Se ultracongela la muestra lavada. Luego, se homogeneizaron los tejidos en tubos Lysing Matrix A (MP Biomedicals) que contenían tampón de lisis RIPA y cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich) y el conjunto I y II de cóctel inhibidor de fosfatasa (EMD-Millipore) usando una máquina Fast Prep (MP Biomedicals). Luego, se sometieron las muestras a un ciclo de congelación-descongelación y a un ciclo de homogeneización adicional antes de la clarificación mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4ºC. Se transfirieron los lisados clarificados a tubos nuevos de 1,5 ml y se midió el contenido de proteínas. Los niveles de HER3 y pHER3 totales se determinan usando un ensayo ELISA de tipo sándwich.

4.18.2. Resultados

Se realizó un estudio de toxicidad de 2C2-YTE de dosis repetidas de 1 mes no GLP con una fase de recuperación de seis semanas en macacos cangrejeros para evaluar la toxicidad y la actividad de 2C2-YTE, cuando se administra una vez a la semana a través de una infusión i.v. para macacos cangrejeros durante al menos 1 mes (5 dosis totales) y para evaluar la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de cualquier efecto después de un periodo de recuperación de 6 semanas. No se observaron efectos adversos después de la administración i.v. una vez por semana (infusión de 5 minutos) de hasta 120 mg/kg/dosis de 2C2-YTE, durante 5 semanas (5 dosis totales), en macacos cangrejeros macho.

La capacidad de 2C2-YTE para bloquear el pHER3 inducido por HRG en la piel de los macacos cangrejeros se confirmó mediante evaluaciones *in vivo* y *ex vivo*. Se observó la supresión completa de HER3 soluble circulante en todos los animales que recibieron 2C2-YTE intravenoso. La estimulación *ex vivo* de biopsias de la piel con HRG dio como resultado un aumento en la razón pHER3:tHER3, lo que demuestra que HER3 presente en la piel de los macacos cangrejeros puede ser activado por HRG, el ligando predominante para HER3. La supresión completa del pHER3 inducido por HRG se logró en todos los grupos tratados con 2C2-YTE al final de la fase de dosificación (datos no mostrados). Por tanto, 2C2-YTE bloqueó la fosforilación de HER3 inducida por HRG *in vivo* y *ex vivo* en muestras de biopsia de piel de macacos cangrejeros.

Lista de secuencias

<110> MedImmune, LLC
<120> MOLÉCULAS DE UNIÓN ESPECÍFICAS PARA HER3 Y USOS DE LAS MISMAS
<130> HER3-100W01
<160> 48
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 1

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
            20                  25                  30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65                  70                  75                  80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
                85                  90                  95

Ser Gly Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 2
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 2

```
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 Tyr Tyr
20 25 30

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro
85 90 95

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

<210> 4
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 4

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Gly Leu
85 90 95

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

<210> 5
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 5

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

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

<210> 6
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 6

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 7
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 7

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 8
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 8

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

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

<210> 9
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 9

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Glu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 10
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 10

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro
85 90 95

Ser Gly Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 11
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 11

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

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

<210> 12
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 12

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 Tyr Tyr
20 25 30

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

Ser Ile Ile Gly Ser Ser Gly Gly Val Thr Asn 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 Val Gly Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 13

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 Tyr Tyr
20 25 30

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

Ser Val Ile Gly Ser Ser Gly Gly Val Thr Asn 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 Val Gly Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> Secuencia sintética
<400> 14

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
            20                  25                  30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65                  70                  75                  80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro
                85                  90                  95

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

<210> 15
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 15

```
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1               5                  10                  15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
            20                  25                  30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65                  70                  75                  80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro
                85                  90                  95

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

<210> 16
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 16

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro
85 90 95

Ser Gly Glu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 17
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 17

Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Met Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 18

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 19
<211> 13

<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 19
Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Leu Asn Tyr Val Ser
1 5 10
<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 20
Arg Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn Tyr Val Ser
1 5 10
<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 21
Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5
<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 22
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Glu Val
1 5 10
<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 23
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro Pro Gly Glu Ala
1 5 10
<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 24
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro Ser Gly Glu Ala
1 5 10
<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 25
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Pro Gly Glu Val
1 5 10
<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 26
Ala Ala Trp Asp Asp Gly Leu Pro Gly Glu Val
1 5 10
<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 27
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ile Gly Glu Val
1 5 10
<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 28
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Glu Ala
1 5 10
<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 29
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro Ser Gly Glu Val
1 5 10
<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 30
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Arg Gly Glu Val
1 5 10
<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 31
Tyr Tyr Tyr Met Gln
1 5
<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 32
Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly
<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 33

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

Gly

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 34

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

Gly

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 35

Val Gly Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 36
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 36

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
20 25 30

<210> 37
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 37

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

<210> 38
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 38

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> Secuencia sintética
<400> 39
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 40
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 40
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys
20
<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 41
Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ser
1 5 10 15
<210> 42
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 42
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 43
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10
<210> 44
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 44
Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Met Ser Cys
20
<210> 45
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 46
<211> 330
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 47
<211> 648
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 47

cagtacgaat tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag tgtcaccatg 60

tcttgttctg ggagcagctc caatatcgga cttaattatg tatcctggta ccagcacctc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctct aggaataatc agcggccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg 240

tccgaagatg aggctgatta ttattgtgca gcatgggatg acagcctgag tggtgaggta 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctc ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact 360

ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata 420

agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtcaag 480

gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc 540

tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg 600

catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gcccctgcag aatgctct 648

<210> 48
<211> 356
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética
<400> 48

gaagttcaat tgttagagtc tggtggcggt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60

tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tattactata tgcagtgggt tcgccaagct 120

cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttat atcggttctt ctggtggcgt tactaattat 180

gctgactccg ttaaaggtcg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240

ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagtaggt 300

cttggggatg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc aagcgc 356

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 que comprende una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, que comprende una VL que comprende SEQ ID NO: 3 y una VH que comprende SEQ ID NO: 2.

2. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, que comprende una región constante de cadena pesada.

3. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 2, en el que la región constante de cadena pesada o fragmento de la misma es una región constante de IgG seleccionada de una región constante de IgG1, una región constante de IgG2, una región constante de IgG3 y una región constante de IgG4.

4. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 2 ó 3, que comprende una región constante de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en una región constante kappa humana y una región constante lambda humana.

5. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 4, en la que la región constante de cadena ligera es una región constante lambda humana.

6. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende una región constante de IgG, y en el que al menos una sustitución de aminoácidos de dominio constante de IgG se selecciona del grupo que consiste en:

(a) sustitución del aminoácido en la posición 252 por tirosina (Y),

(b) sustitución del aminoácido en la posición 254 por treonina (T),

(c) sustitución del aminoácido en la posición 256 por ácido glutámico (E),

en el que la numeración es según el índice EU tal como se expone en Kabat.

7. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según las reivindicaciones 2 a 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo multiespecífico, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, y en el que el fragmento de unión a antígeno es Fv, Fab, F(ab')2, Fab', dsFv, scFv, o sc(Fv)2.

8. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 6, que comprende (i) una cadena ligera de anticuerpo que comprende una VL de anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 3 y una región constante de cadena ligera lambda humana, y (ii) una cadena pesada de anticuerpo que comprende una VH de anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 2 y una región constante de cadena pesada de IgG1 humana, en el que la región constante de IgG1 humana comprende sustituciones de aminoácidos en relación con un dominio constante de IgG1 humana de tipo natural en las posiciones 252, 254, y 256, en el que la numeración es según el índice EU tal como se expone en Kabat, y en el que

(a) el aminoácido en la posición 252 (metionina) se sustituye por tirosina (Y),

(b) el aminoácido en la posición 254 (serina) se sustituye por treonina (T), y

(c) el aminoácido en la posición 256 (treonina) se sustituye por ácido glutámico (E).

9. Composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 y un portador farmacéuticamente aceptable.

10. Ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8.

11. Vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 10.

12. Célula huésped que comprende una secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 10 o el vector según la reivindicación 11.

13. Método de obtención del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las

reivindicaciones 2 a 8, que comprende (a) cultivar la célula según la reivindicación 12; y (b) aislar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

14. Kit que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, o la composición según la reivindicación 9.

15. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, para su uso en la reducción de la proliferación celular, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a HER3.

16. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8.

17. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, para su uso según la reivindicación 16, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello y melanoma, y en el que opcionalmente el cáncer comprende células que comprenden una mutación de KRAS.

18. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer agente que es el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, que es un agente antineoplásico distinto del primer agente.

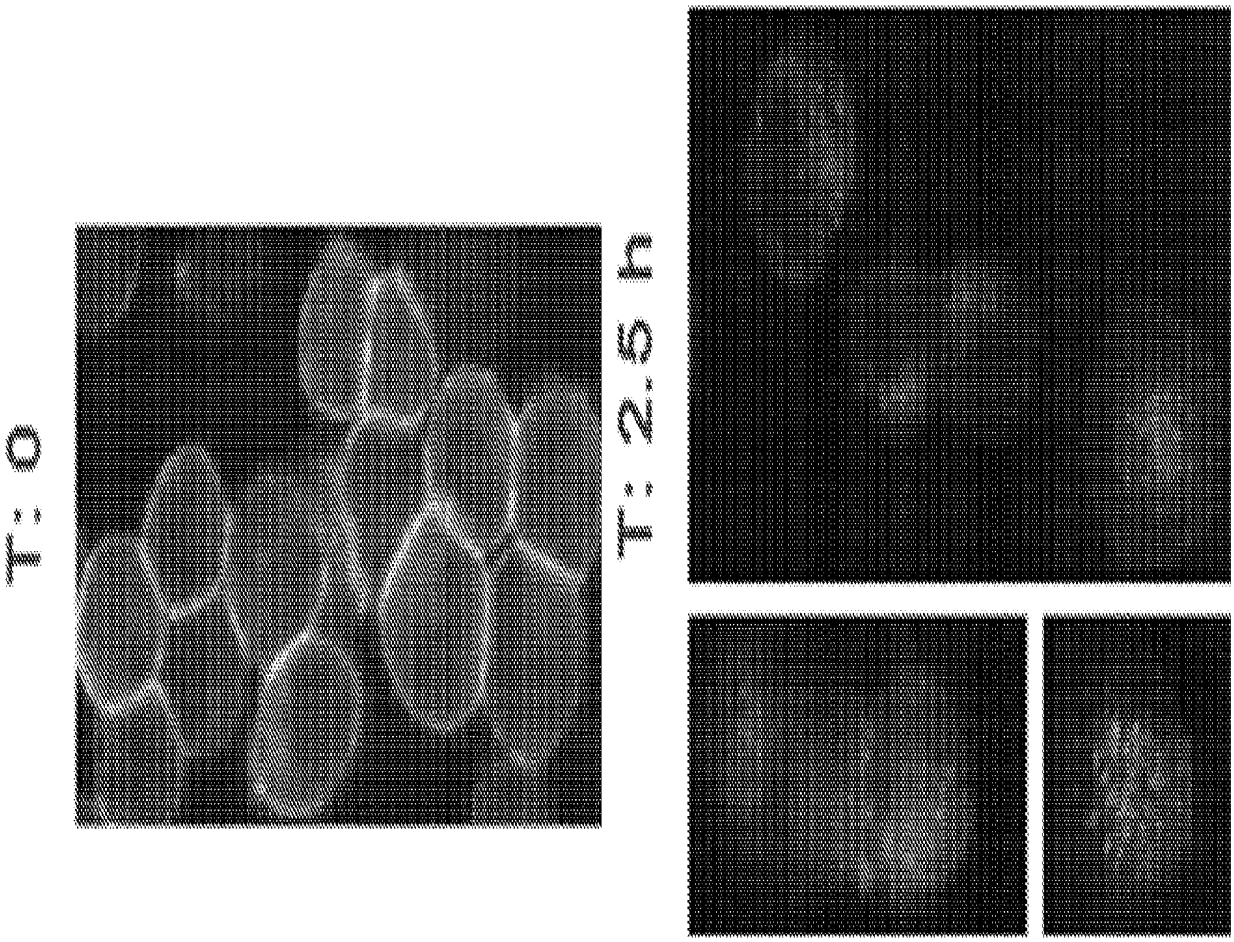


Fig. 1

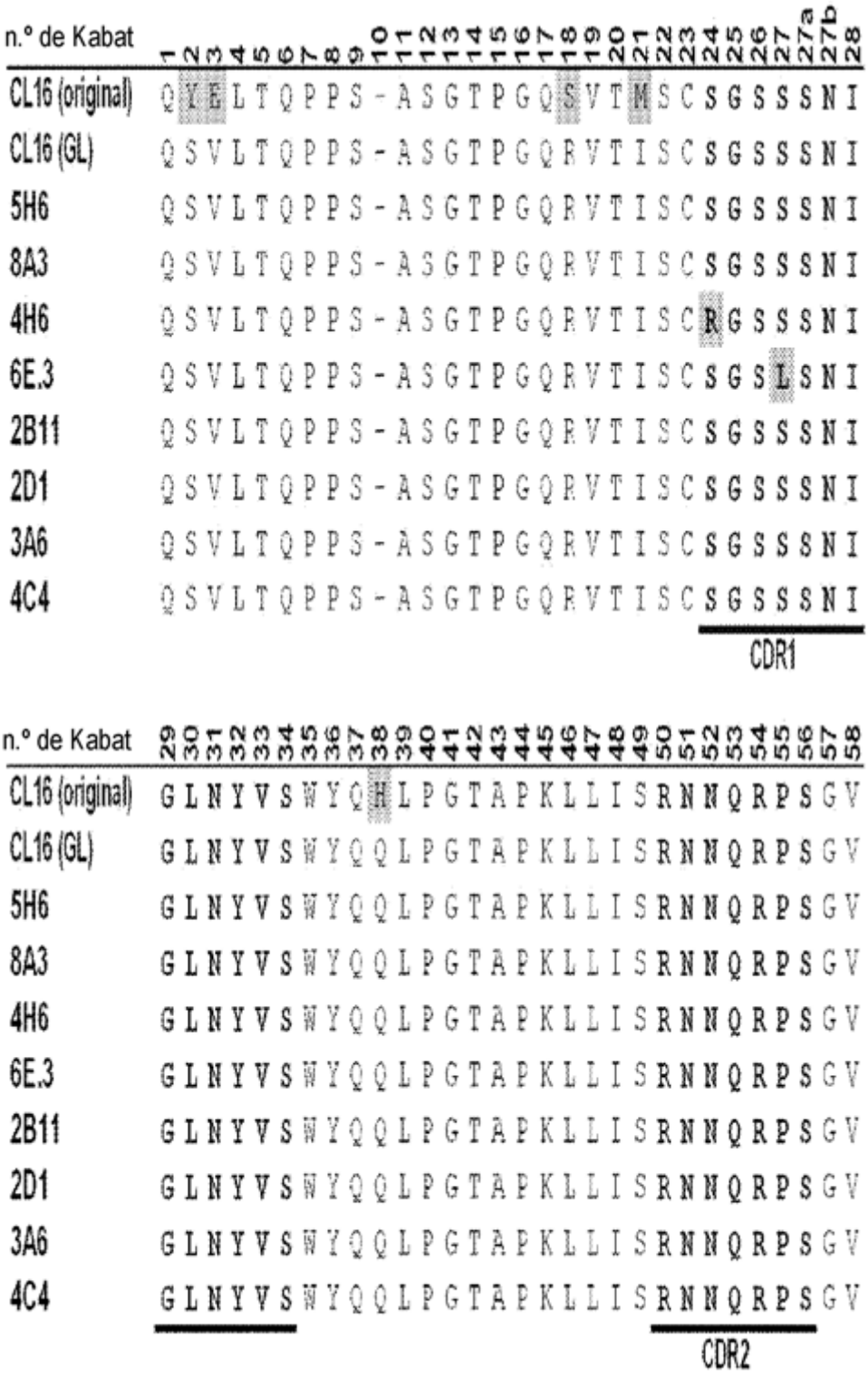


Fig. 2A parte I

n.º de Kabat	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
CL16 (original)	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C
CL16 (GL)	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C
5H6	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C
8A3	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C
4H6	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C
6E.3	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C
2B11	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C
2D1	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C
3A6	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C
4C4	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C

n.º de Kabat	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
CL16 (original)	A	A	W	D	D	S	L	S	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
CL16 (GL)	A	A	W	D	D	S	L	S	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
5H6	A	A	W	D	D	G	L	P	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
8A3	A	A	W	D	D	S	L	I	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
4H6	A	A	W	D	D	S	L	S	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
6E.3	A	A	W	D	D	S	L	S	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
2B11	A	A	W	D	D	S	L	P	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
2D1	A	A	W	D	D	S	L	S	G	E	A	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
3A6	A	A	W	D	D	S	P	S	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
4C4	A	A	W	D	D	S	L	R	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L

CDR3

Fig. 2A parte II

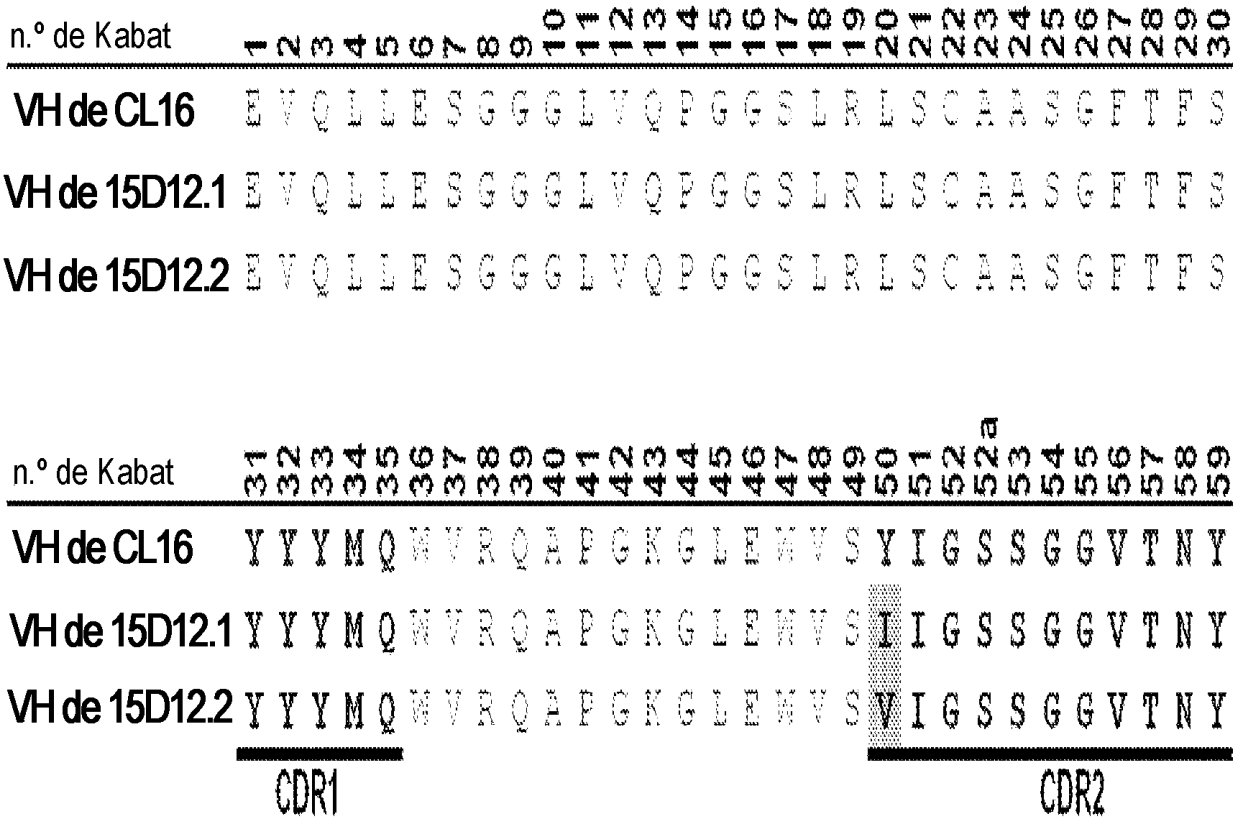


Fig. 2B parte I

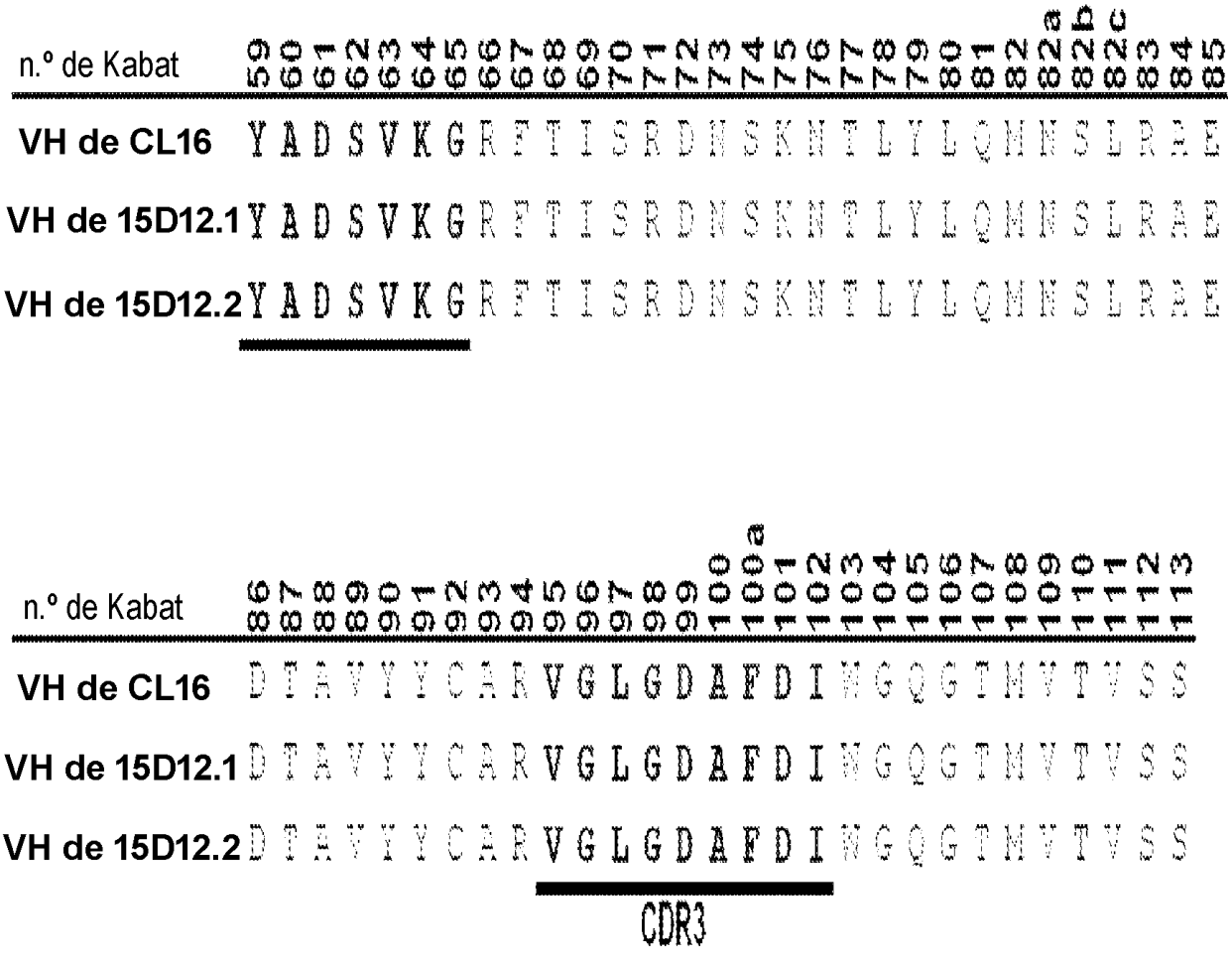


Fig. 2B parte II

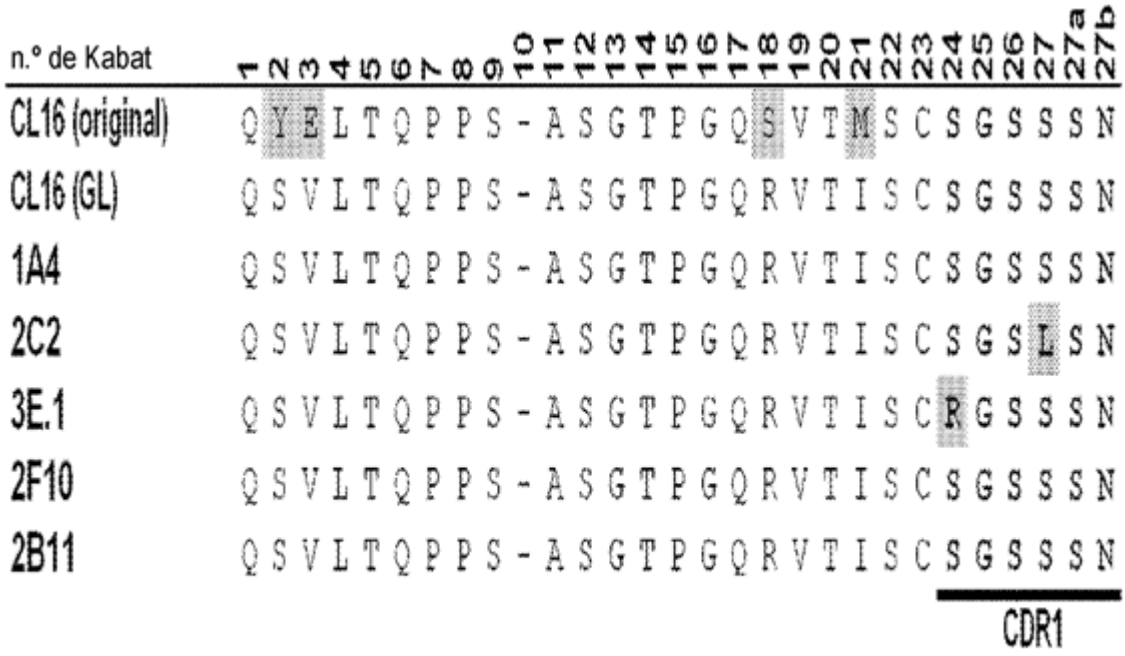


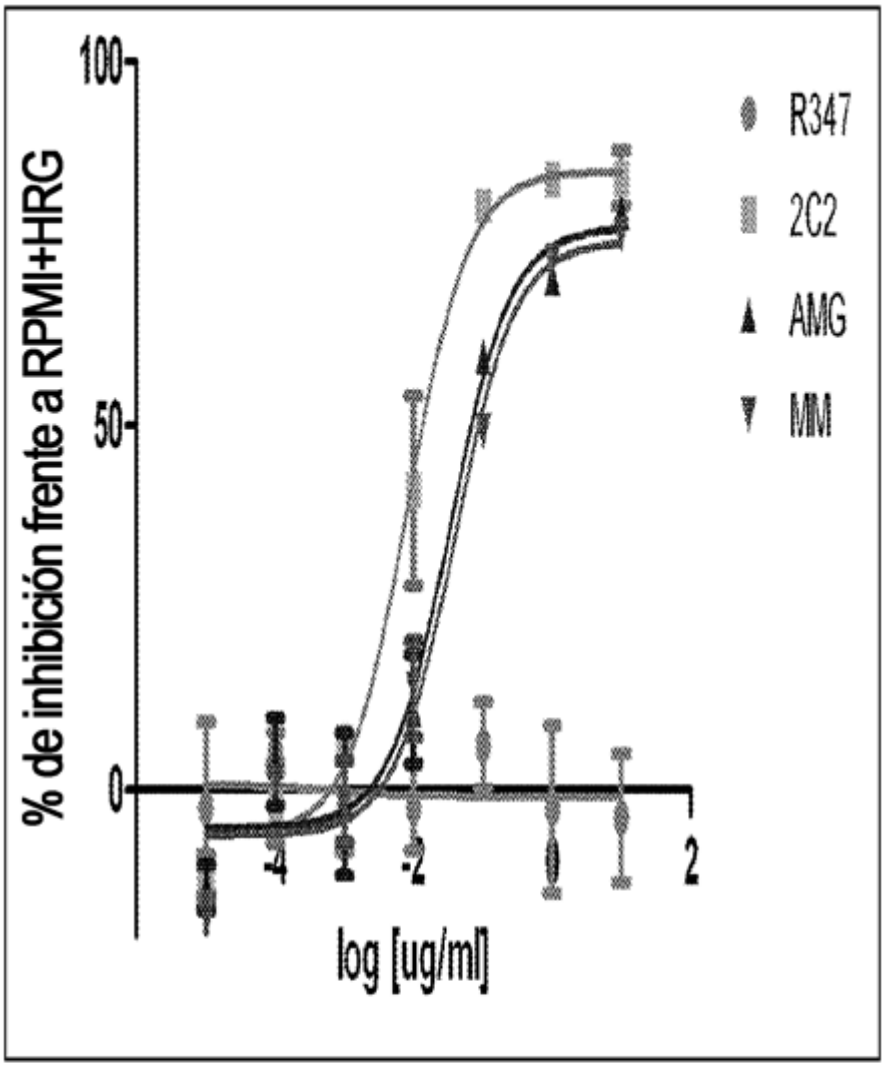
Fig. 2C parte I

n.º de Kabat	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
CL16 (original)	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D
CL16 (GL)	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D
1A4	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D
2C2	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D
3E.1	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D
2F10	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D
2B11	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D

n.º de Kabat	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
CL16 (original)	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	L	S	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
CL16 (GL)	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	L	S	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
1A4	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	P	P	G	E	A	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
2C2	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	P	P	G	E	A	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
3E.1	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	P	P	G	E	A	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
2F10	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	P	S	G	E	A	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
2B11	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	L	P	G	E	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L

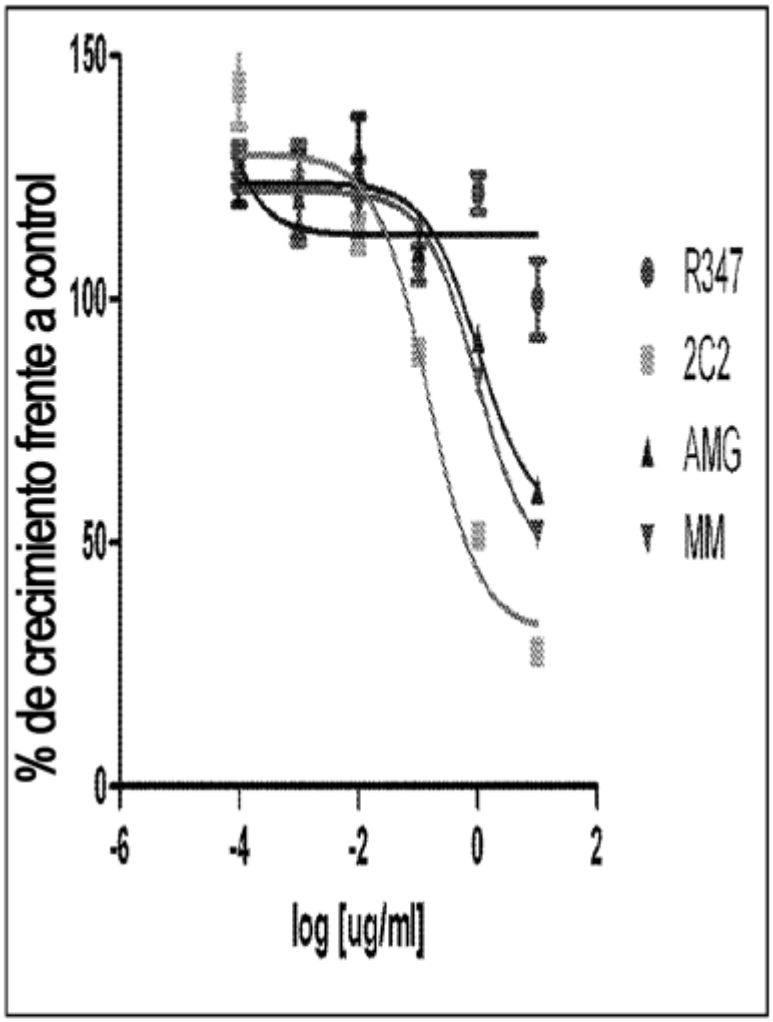
CDR3

Fig. 2C parte II



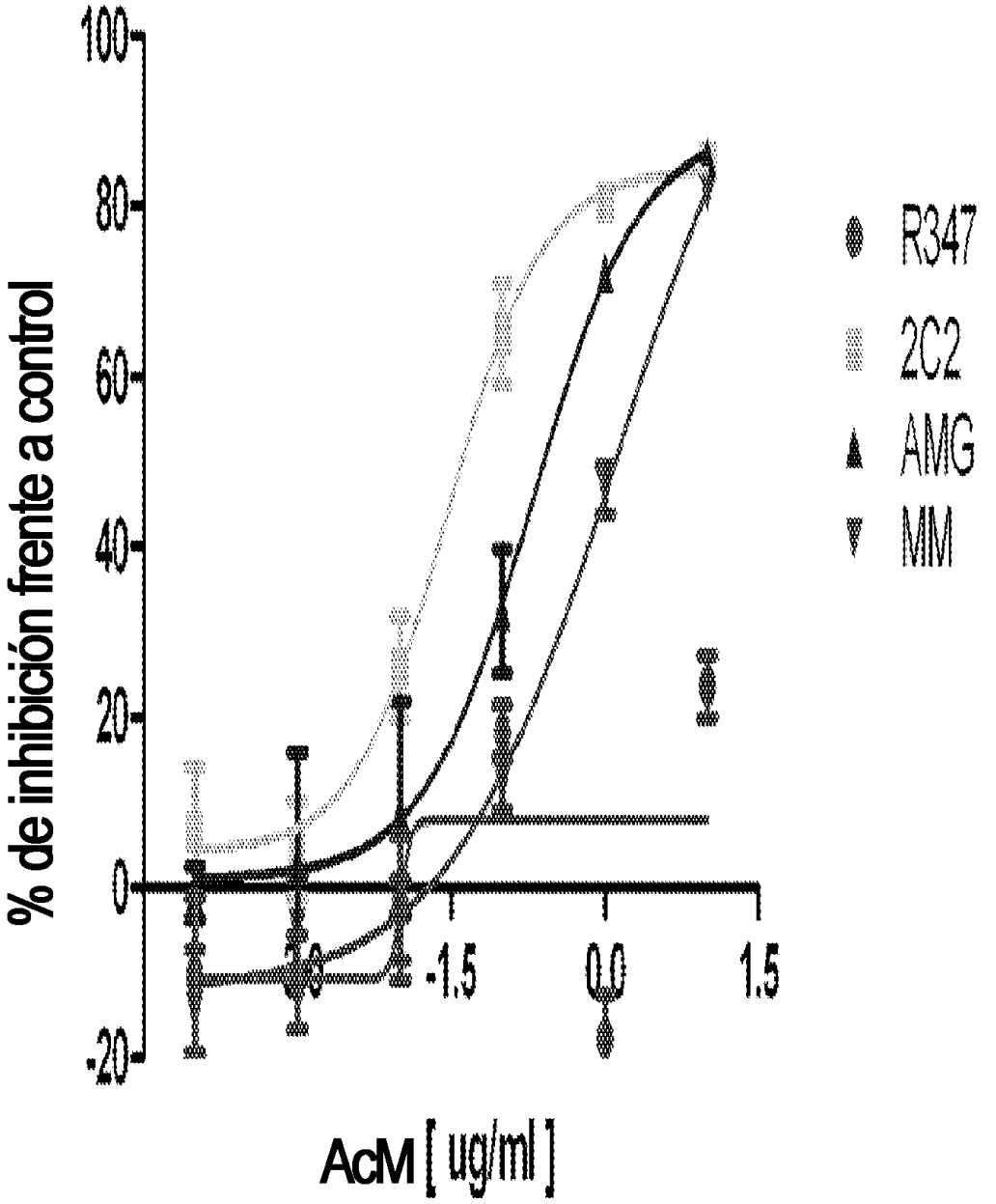
	2C2	AMG	MM
% de inhibición máxima	85	77	75
CI50 (ng/ml)	8.4	33	39

Fig. 3



	2C2	AMG	MM
% de inhibición máxima	72	39	49
CI50 (ug/ml)	0.14	0.99	0.95

Fig. 4



	2C2	AMG	MM
CI50 (ug/ml)	0.027 ug/ml	1.729 ug/ml	0.209 ug/ml

Fig. 5

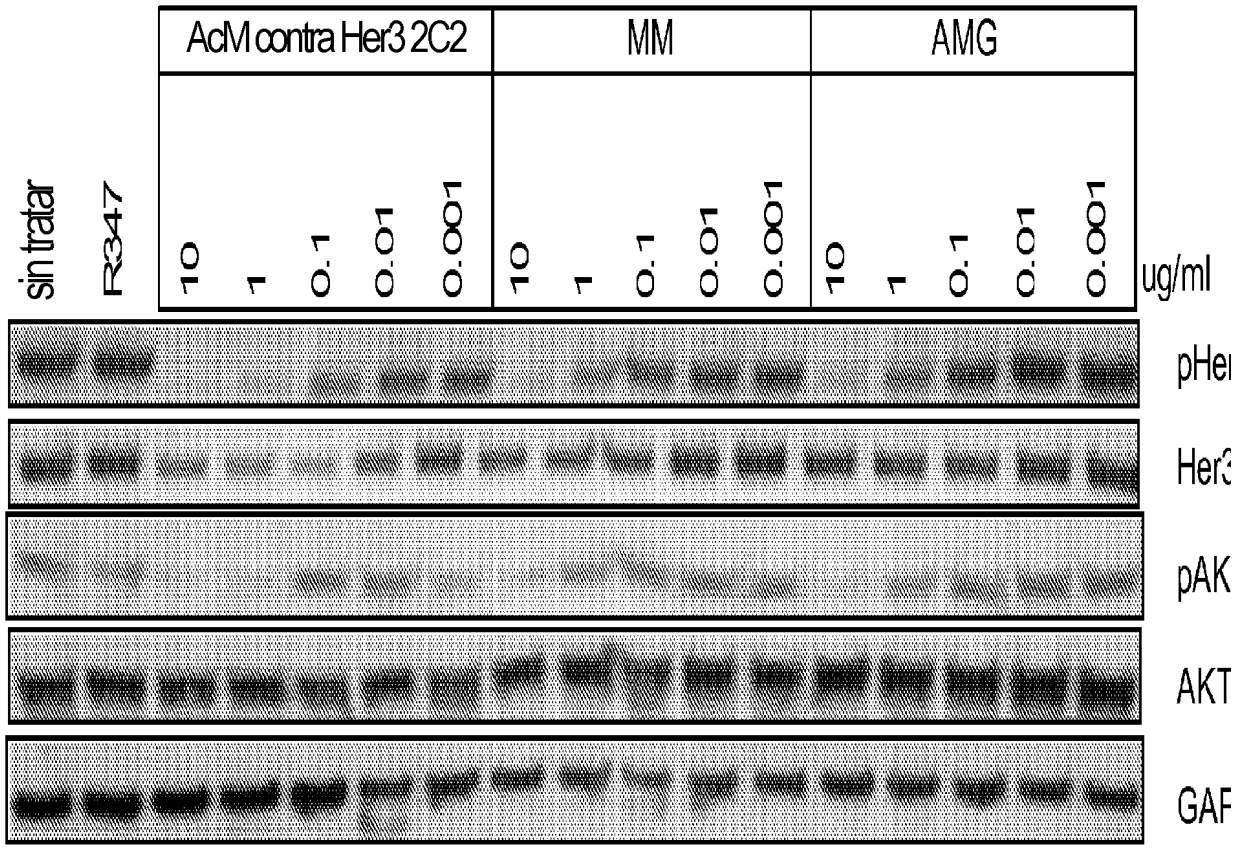

AcM contra Her3 2C2
MM
AMG
sin tratar
R347
10
1
0.1
0.01
0.001
ug/ml
pHer
Her3
pAK
AKT
GAF

Fig. 6

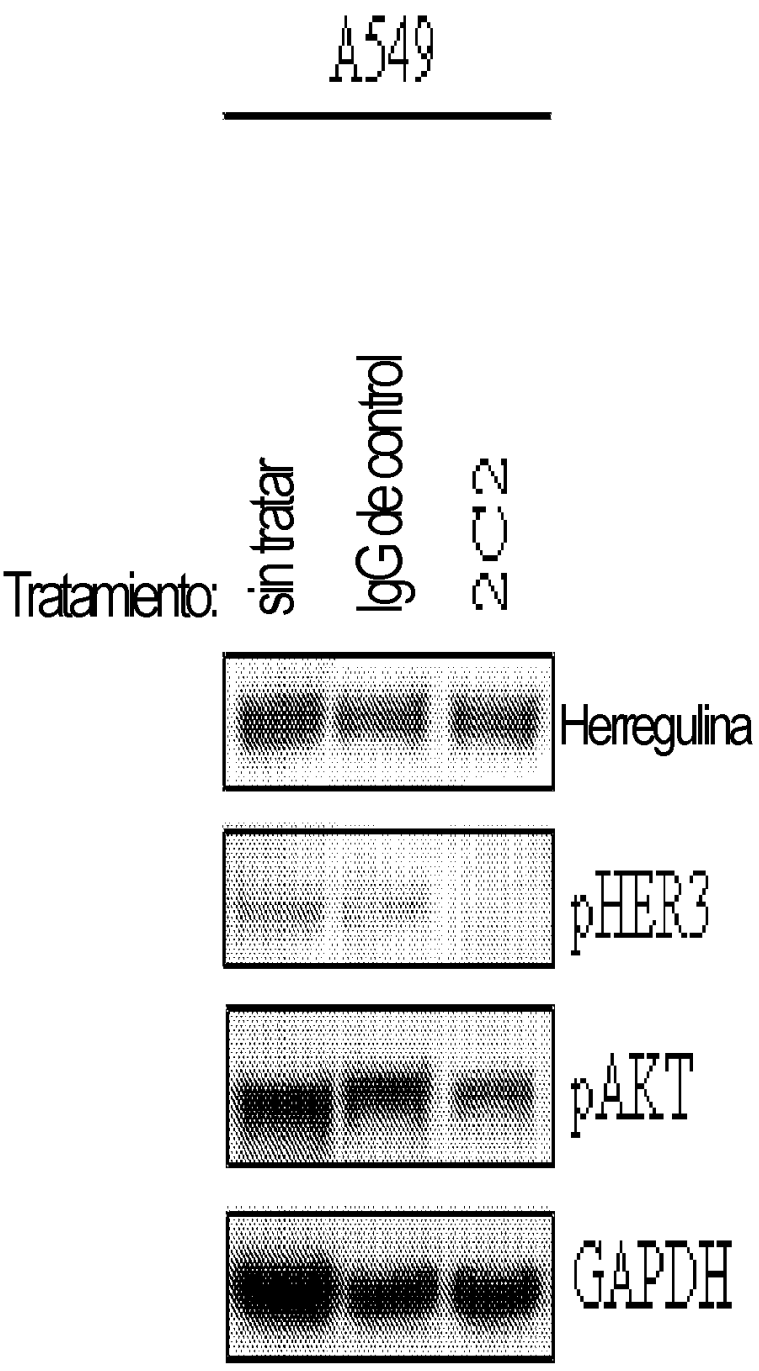
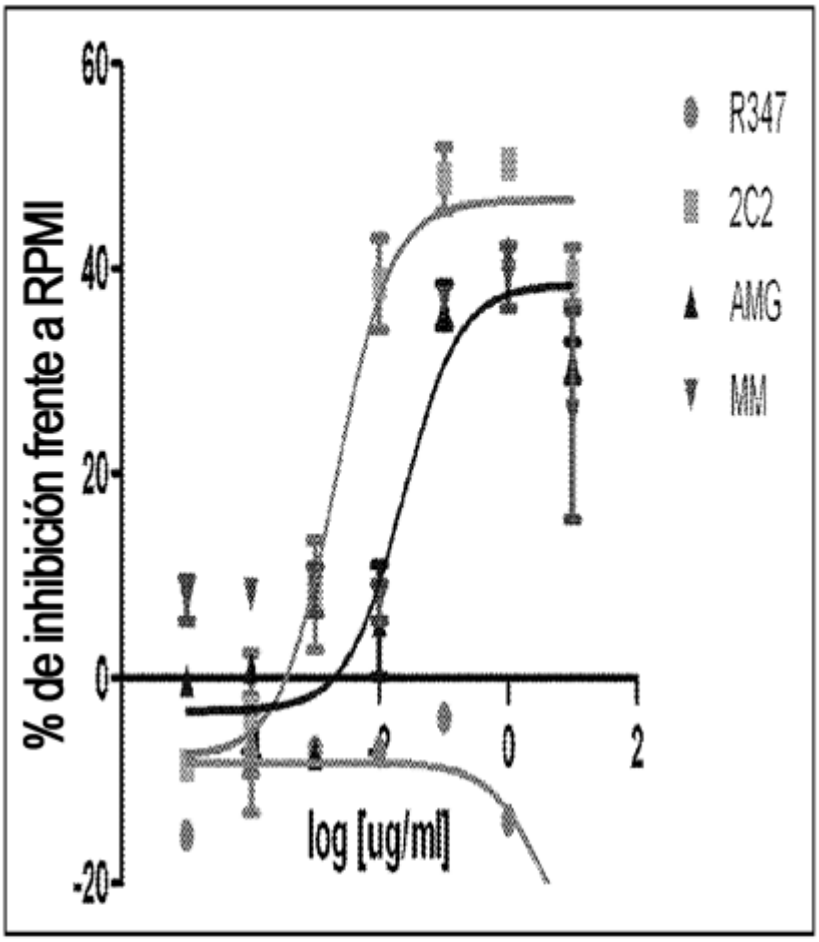
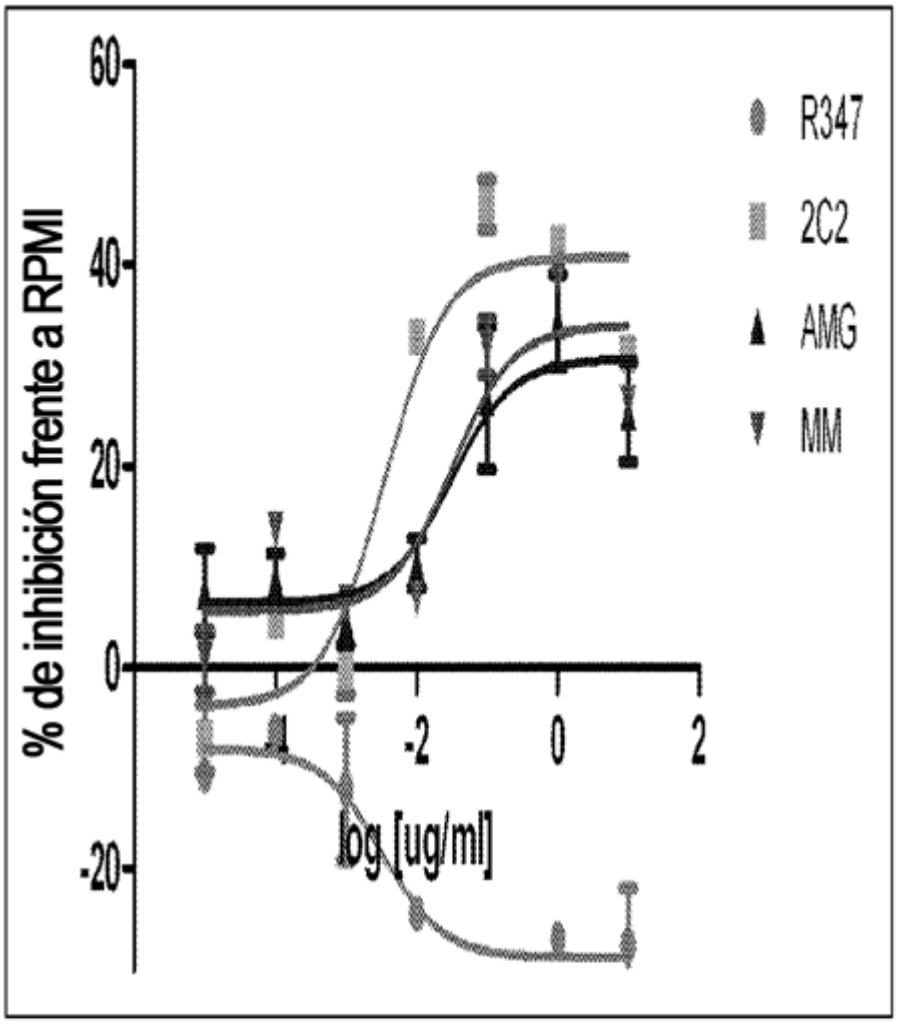

A549
Tratamiento:
sin tratar
IgG de control
2C2
Herregulina
pHER3
pAKT
GAPDH

Fig. 7



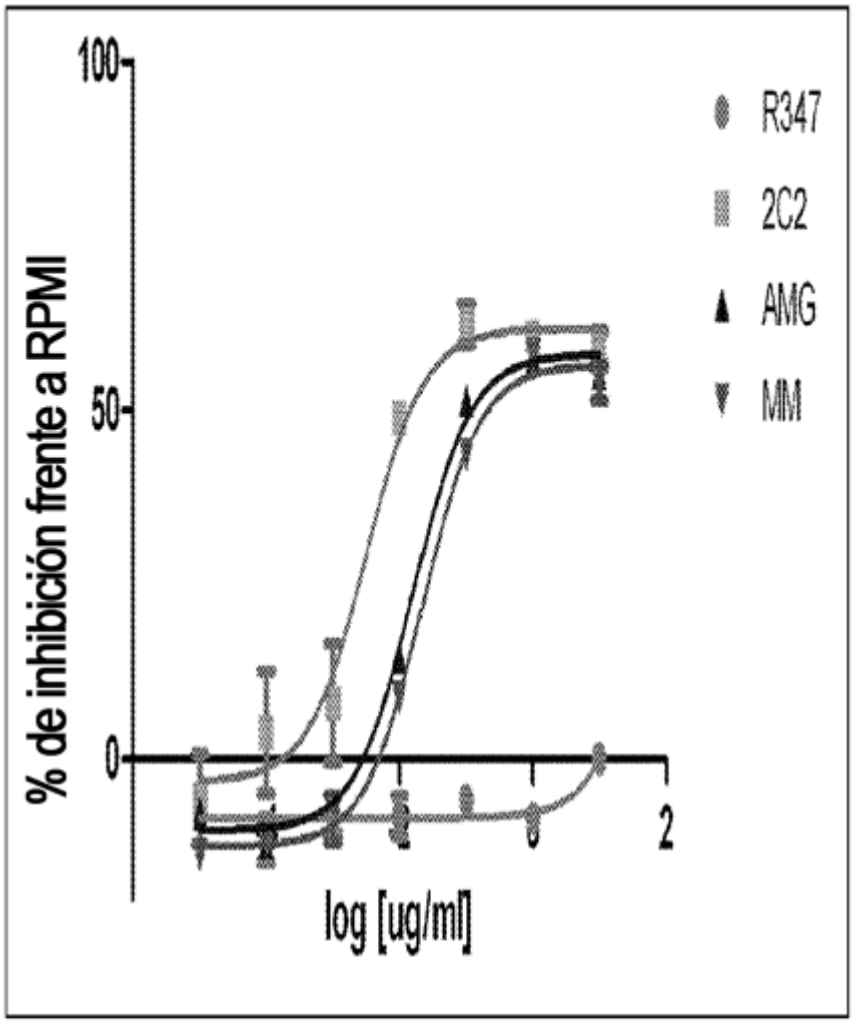
	2C2	AMG	MM
% de inhibición máxima	54	41	
CI50 (ng/ml)	2	23	

Fig. 8A



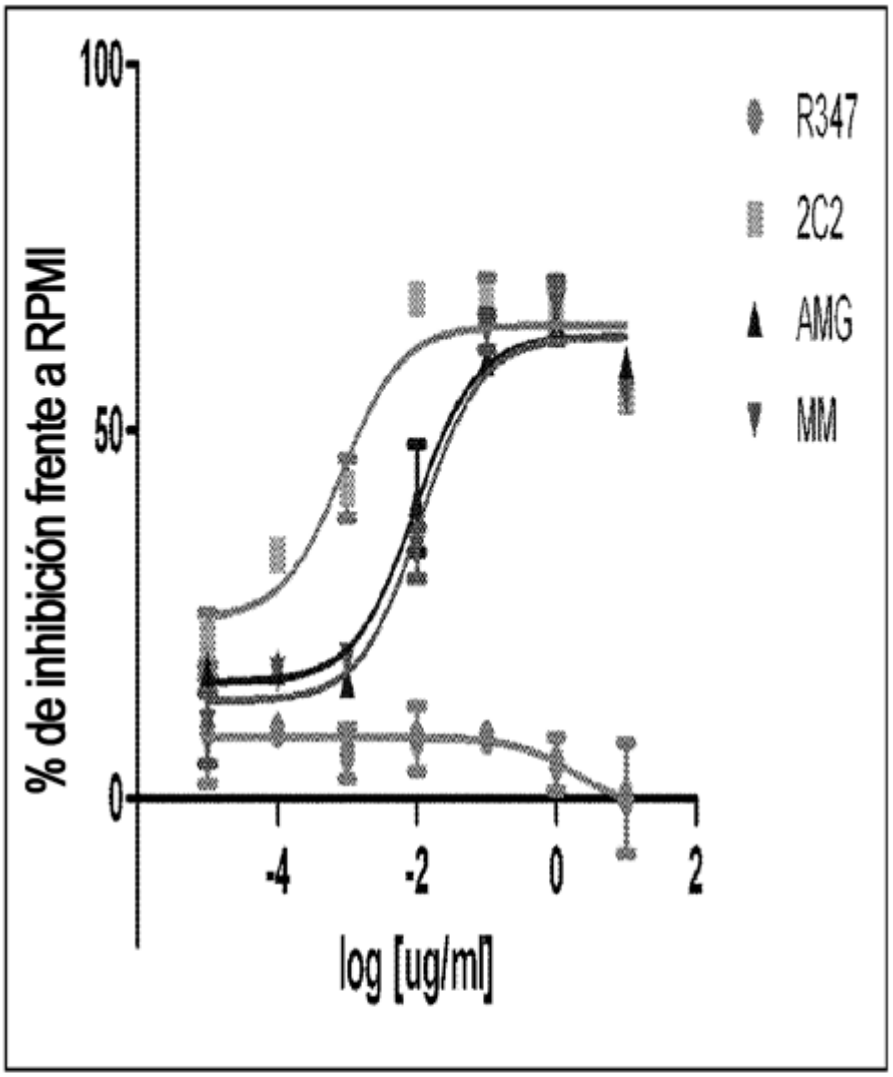
	2C2	AMG	MM
% de inhibición máxima	45	24	28
CI50 (ng/ml)	3.5	31	32

Fig. 8B



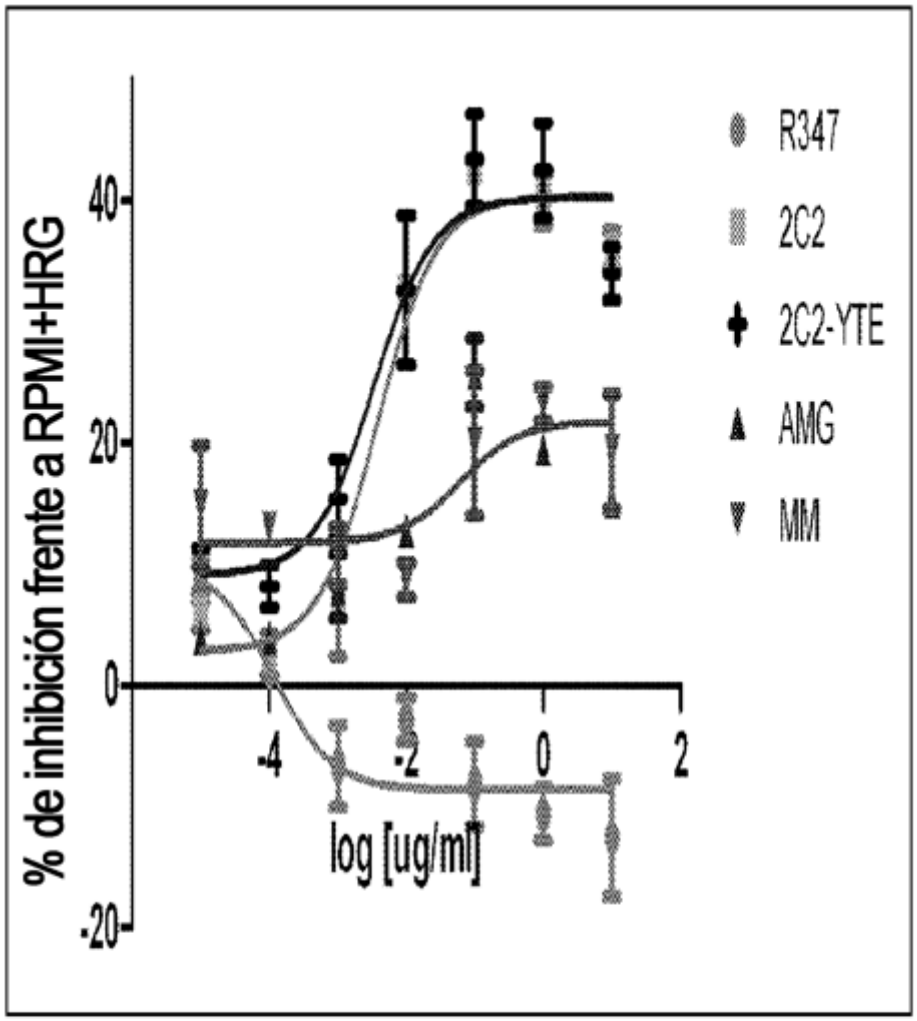
	2C2	AMG	MM
% de inhibición máxima	62	58	57
CI50 (ng/ml)	3.2	16.1	22.1

Fig. 8C



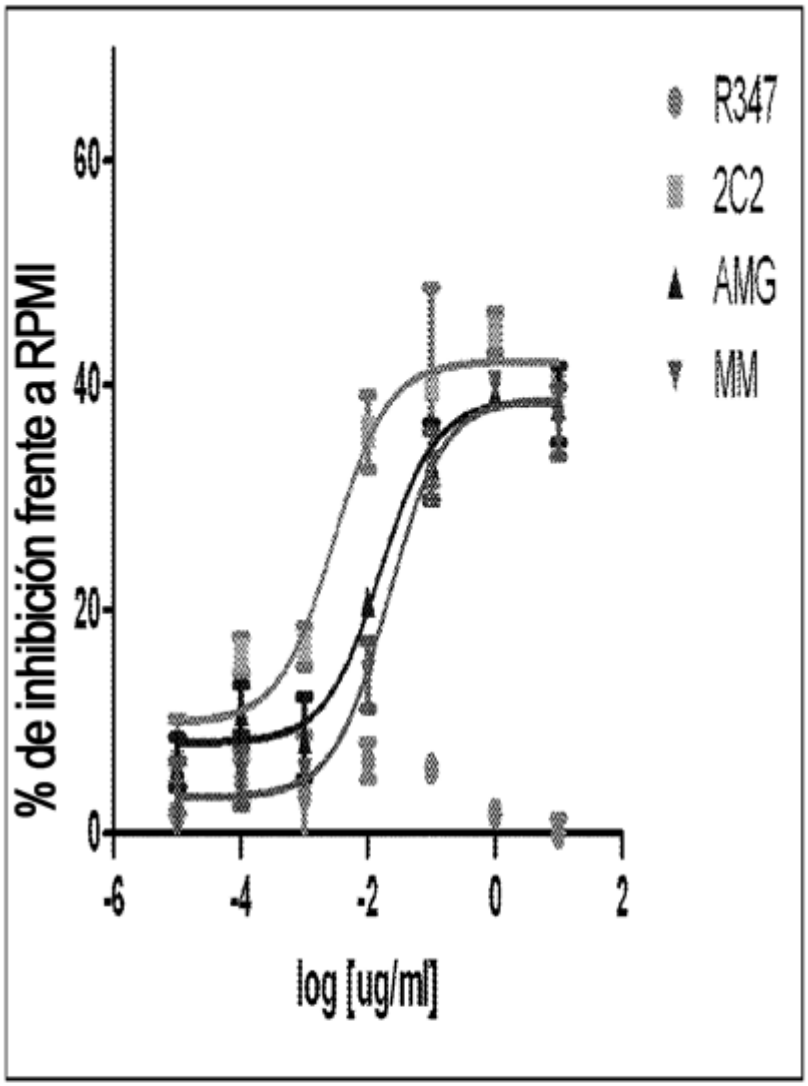
	2C2	AMG	MM
% de inhibición máxima	64	62	62
CI50 (ng/ml)	0.8	9.6	12.6

Fig. 8D



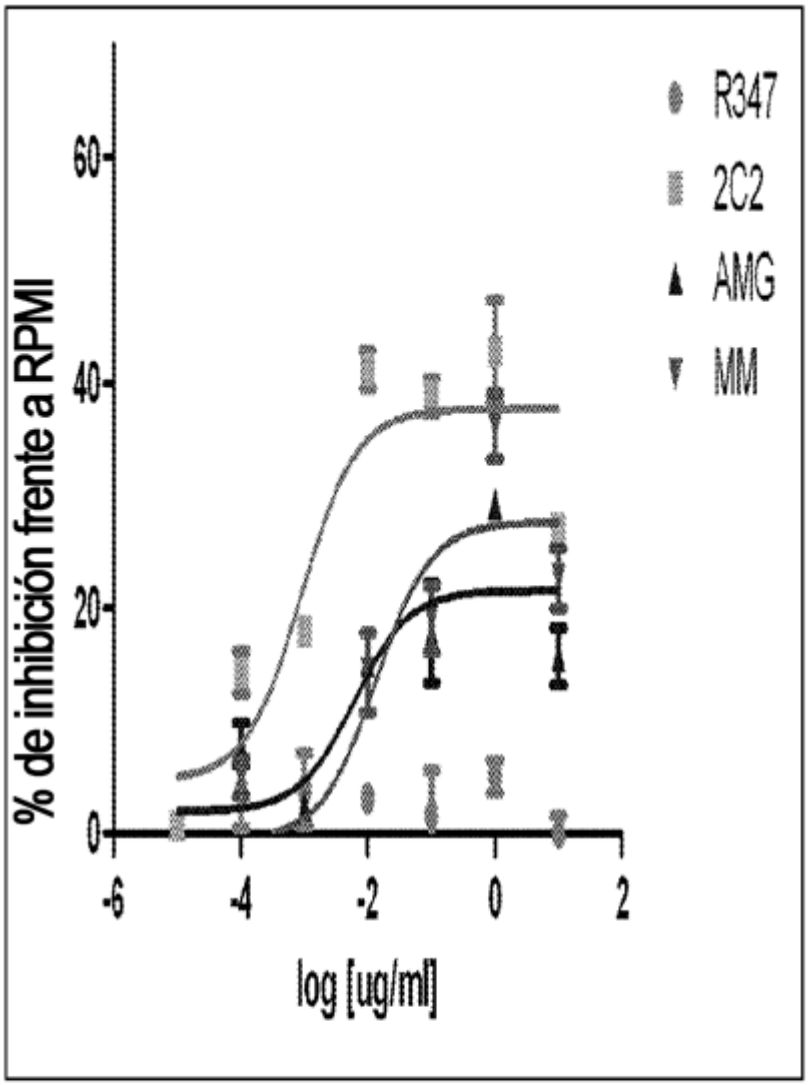
	2C2	AMG	MM
CI50 (ug/ml)	0.004	>10	>10
% de inhibición máxima	41		

Fig. 8E



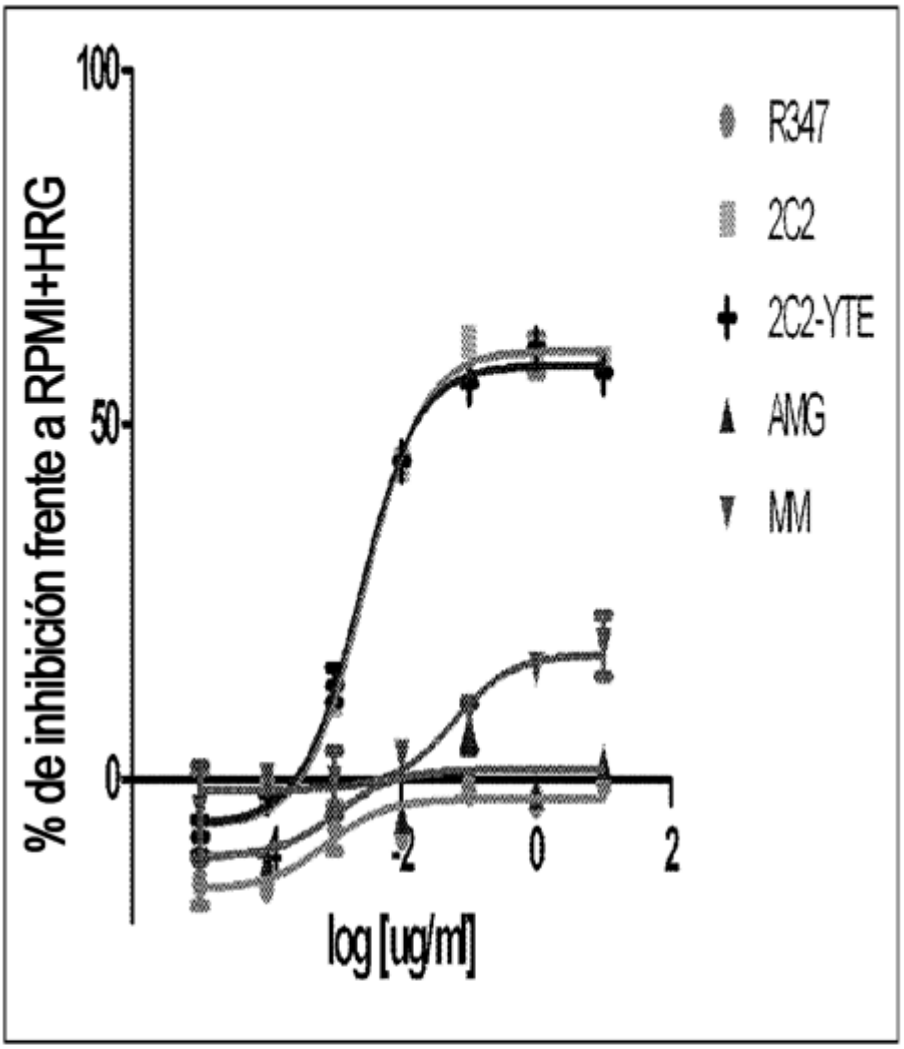
	2C2	AMG	MM
% de inhibición máxima	42	38	38
CI50 (ng/ml)	2.9	15.8	21.2

Fig. 9A



	2C2	AMG	MM
% de inhibición máxima	38	22	28
CI50 (ng/ml)	0.9	6.2	13.6

Fig. 9B



	2C2	AMG	MM
CI 50 (ug/ml)	0.003	>10	>10
% de inhibición máxima	60	1	17

Fig. 9C

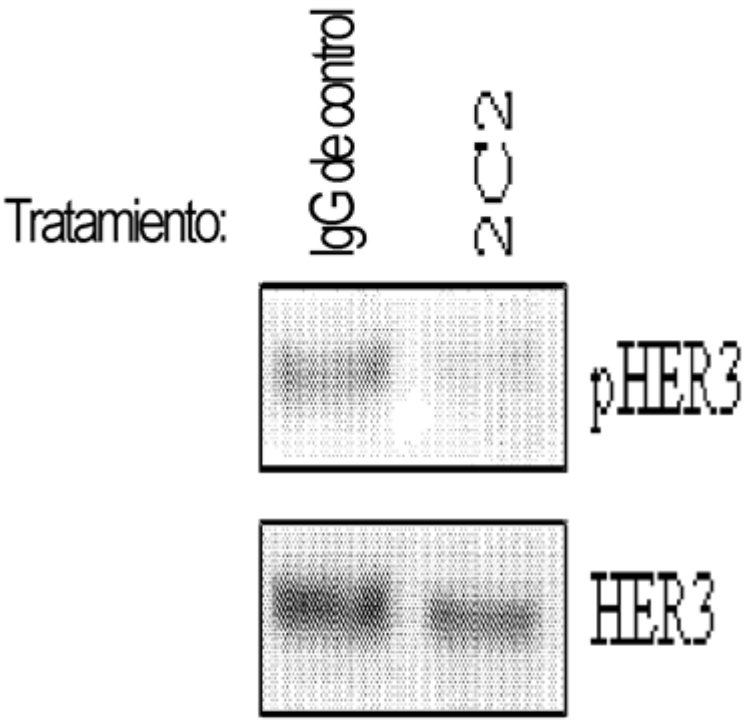


Fig. 10A

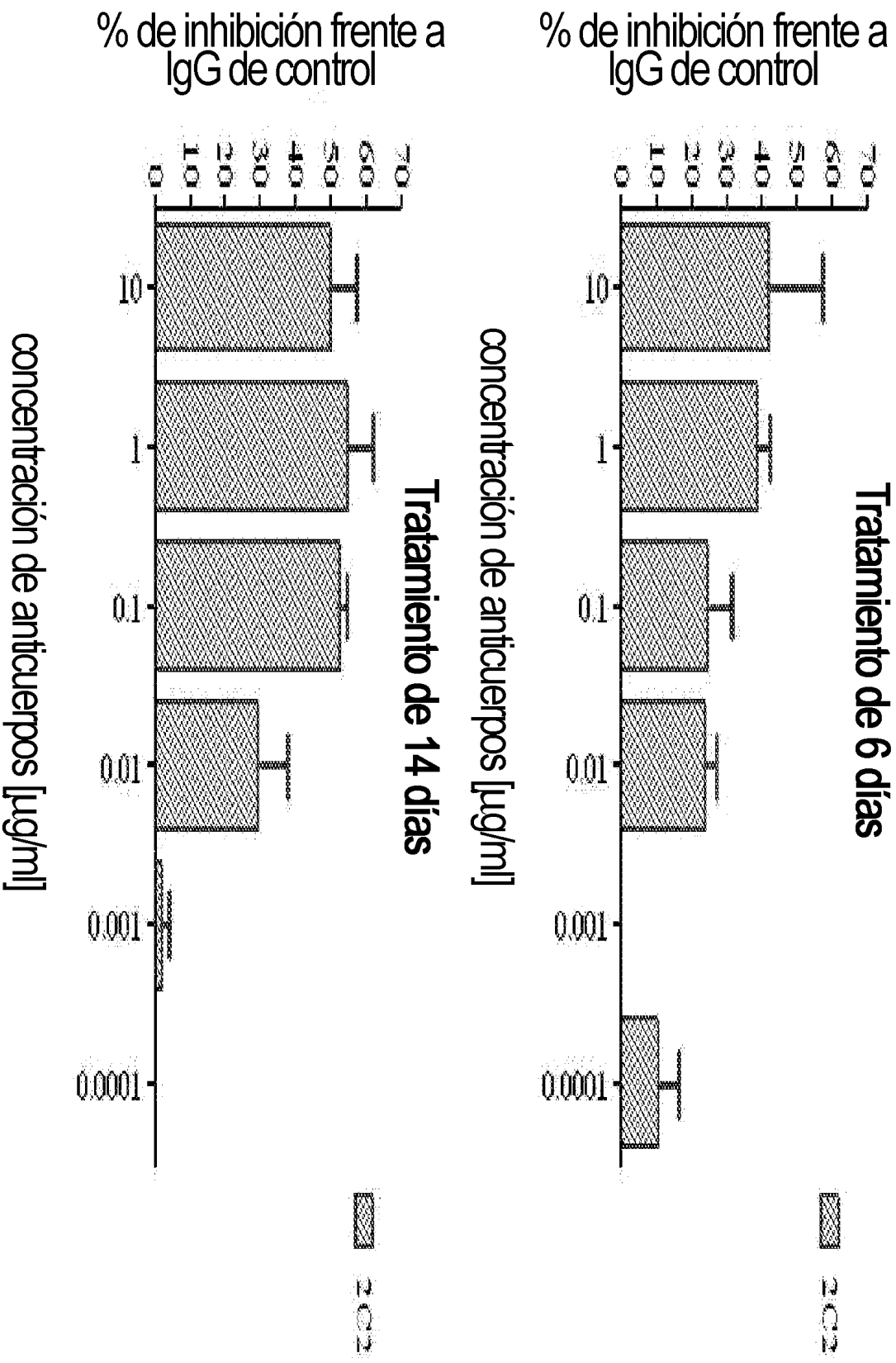

% de inhibición frente a IgG de control
0
10
20
30
40
50
60
70
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
concentración de anticuerpos [µg/ml]
Tratamiento de 14 días
% de inhibición frente a IgG de control
Tratamiento de 6 días
concentración de anticuerpos [µg/ml]

Fig. 10B

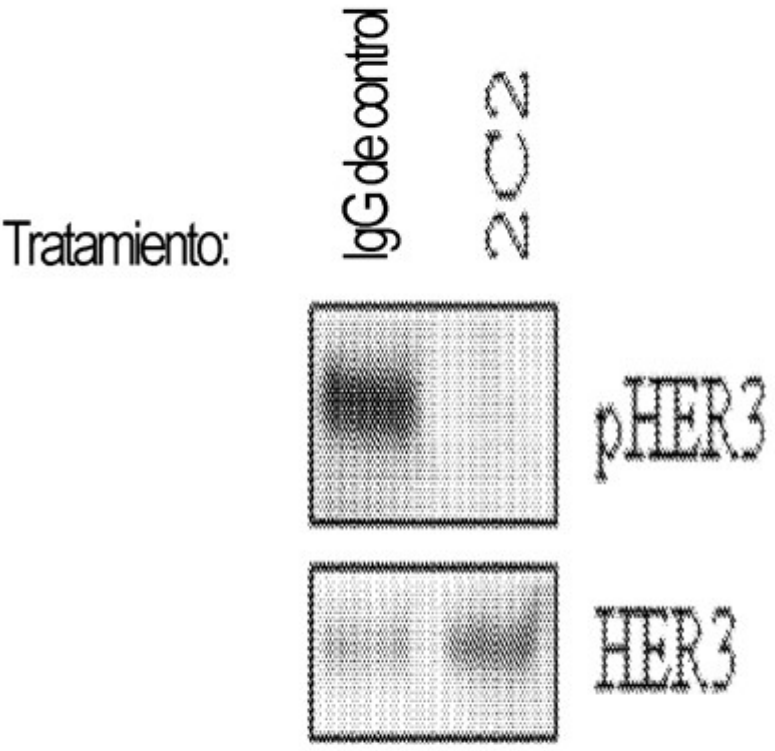


Fig. 11

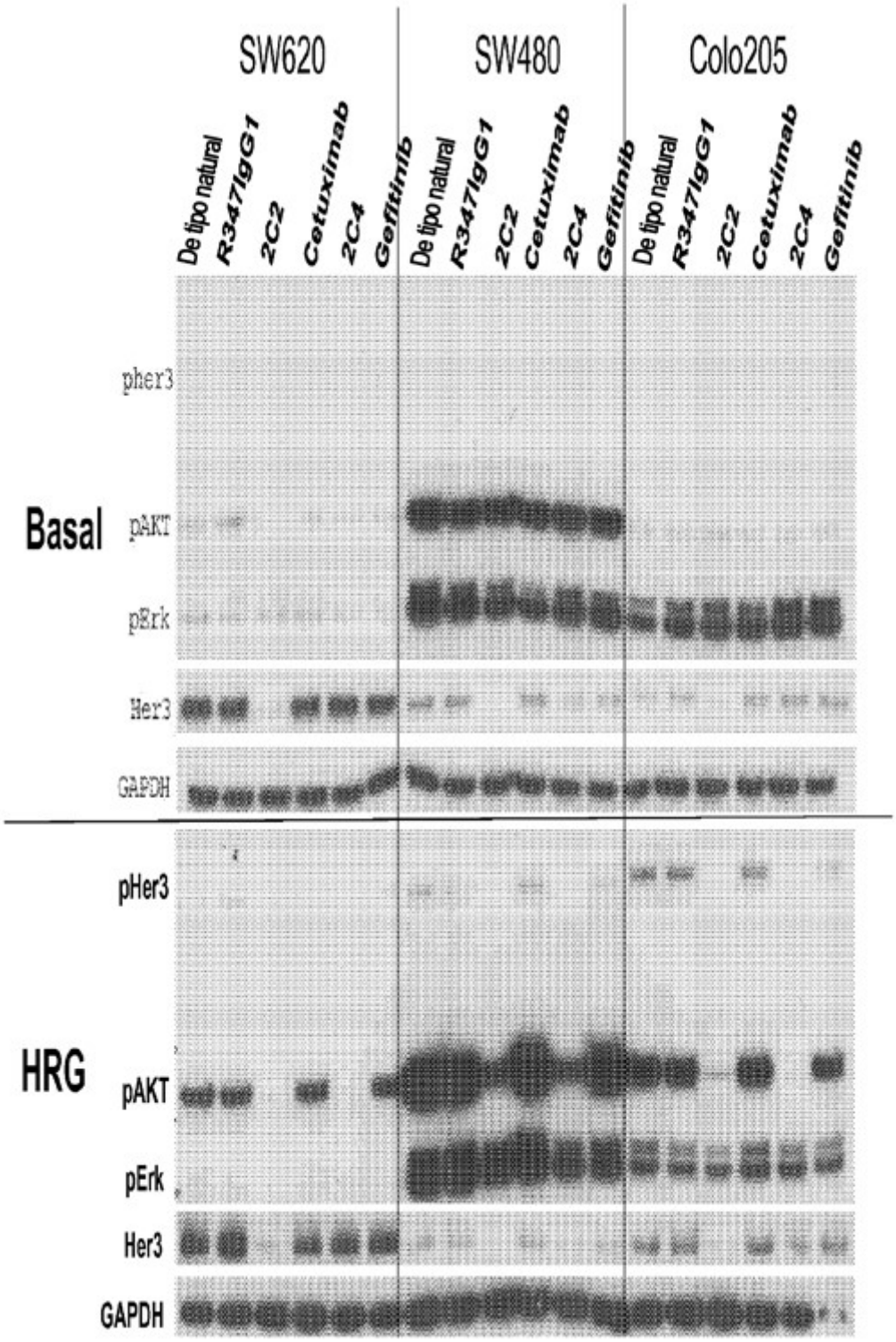

SW620
SW480
Colo205
De tipo natural
R347IgG1
2C2
Cetuximab
2C4
Gefitinib
pher3
Basal
pAKT
pErk
Her3
GAPDH
pHer3
HRG
pAKT
pErk
Her3
GAPDH

Fig. 12A

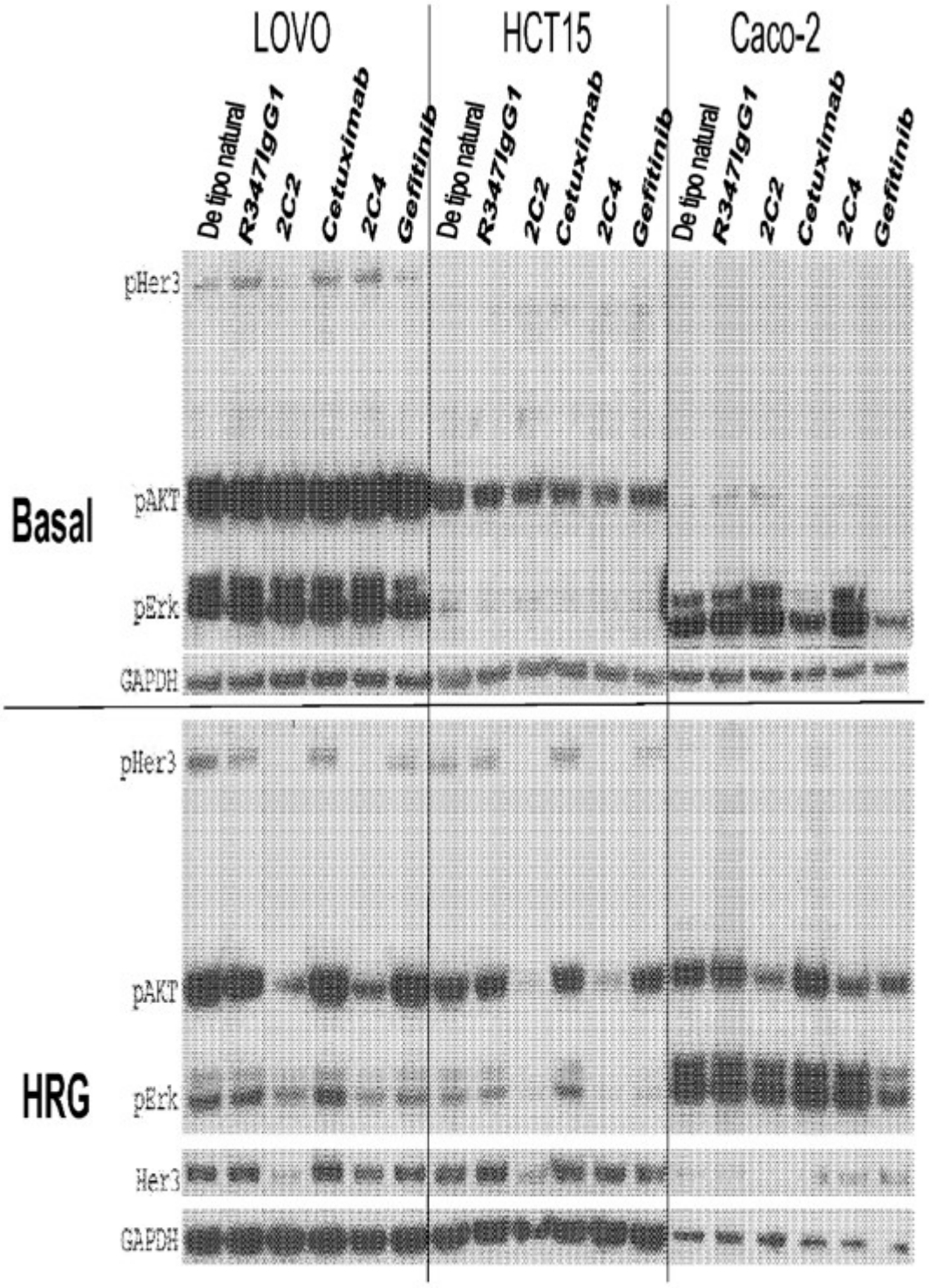

LOVO
HCT15
Caco-2
De tipo natural
R347IgG1
2C2
Cetuximab
2C4
Gefitinib
Basal
HRG
pHer3
pAKT
pErk
Her3
GAPDH

Fig. 12B

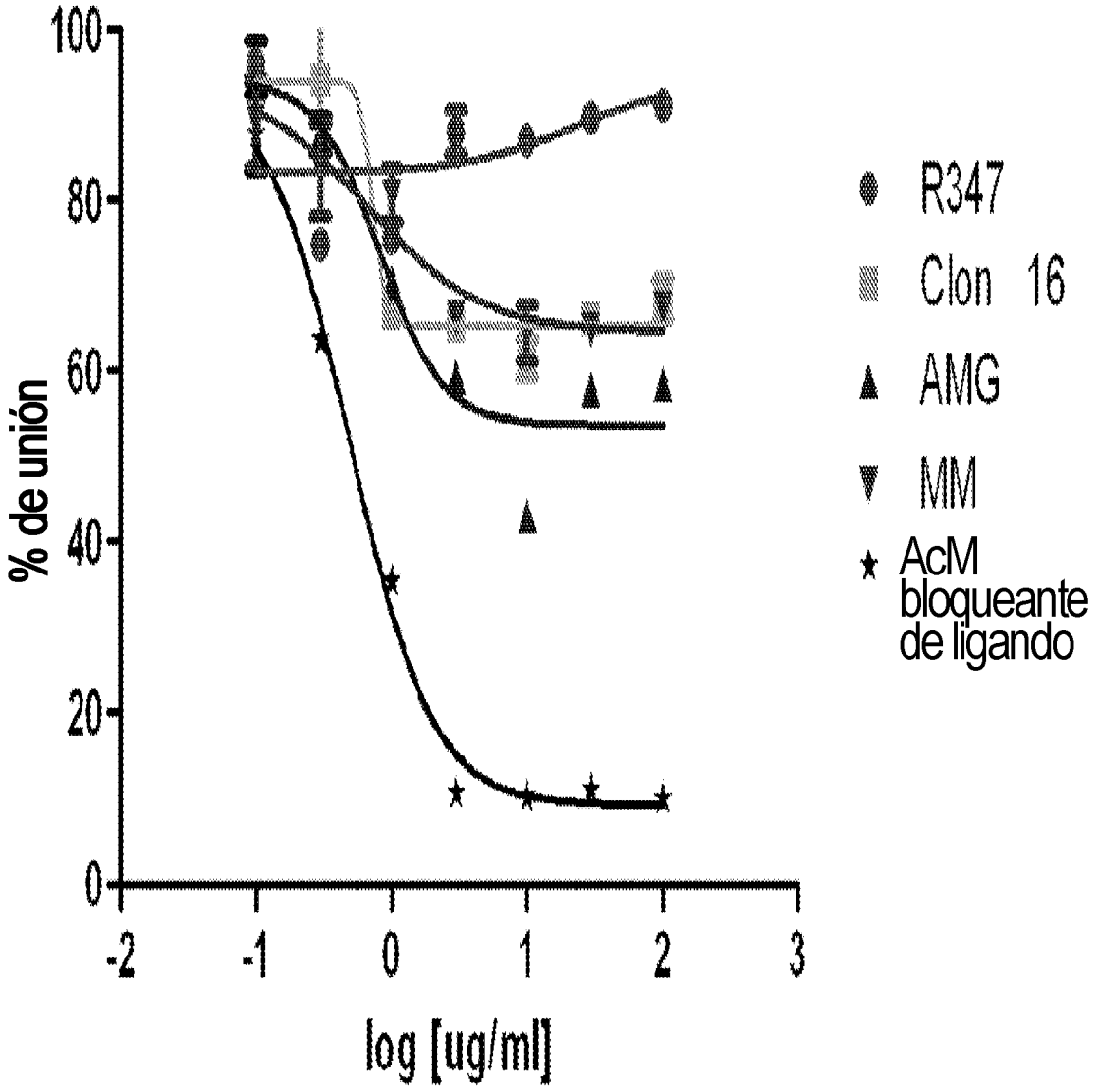

100
80
60
40
20
0
% de unión
-2
-1
0
1
2
3
log [ug/ml]
R347
Clon 16
AMG
MM
AcM bloqueante de ligando

Fig. 13

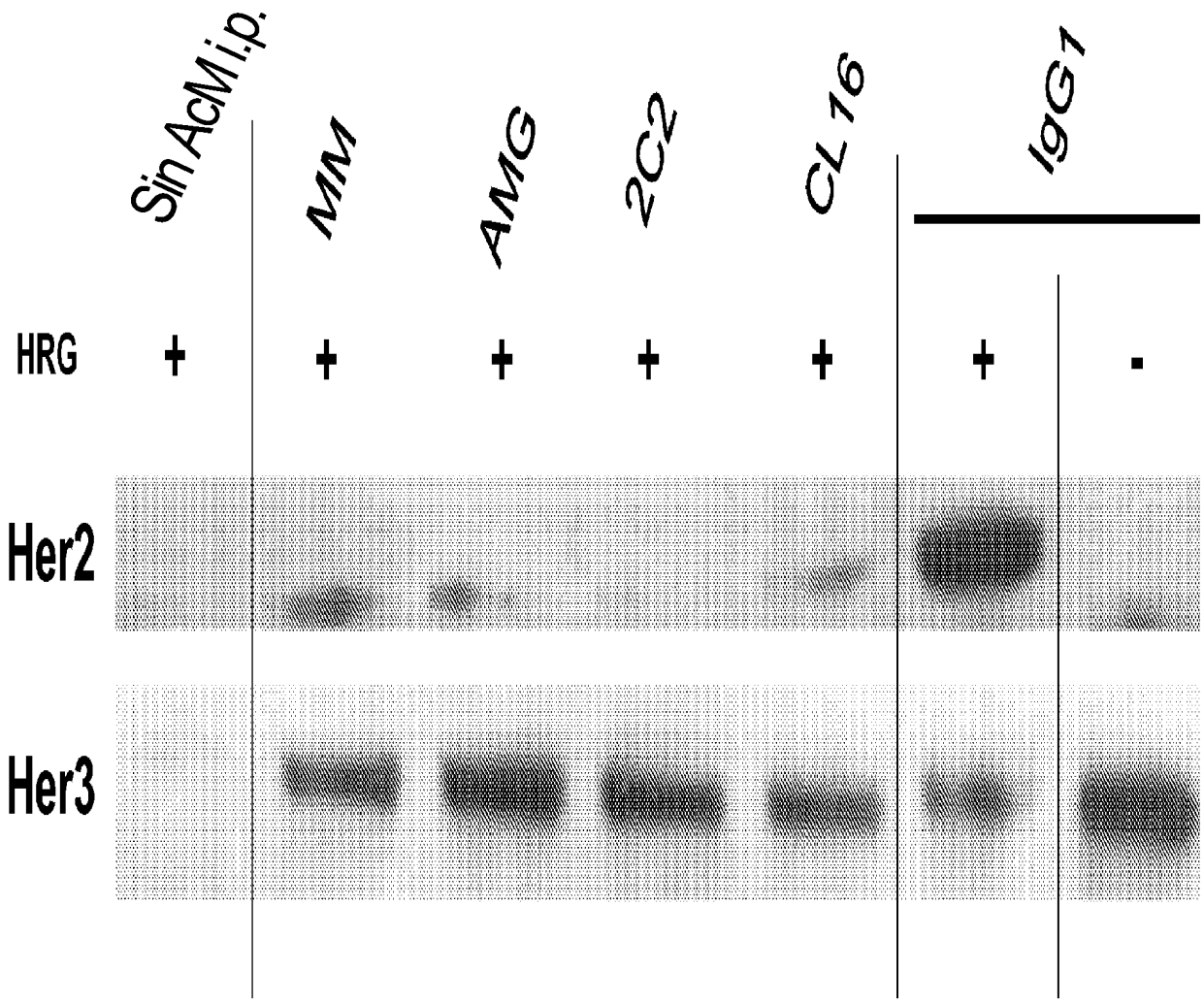


Fig. 14A

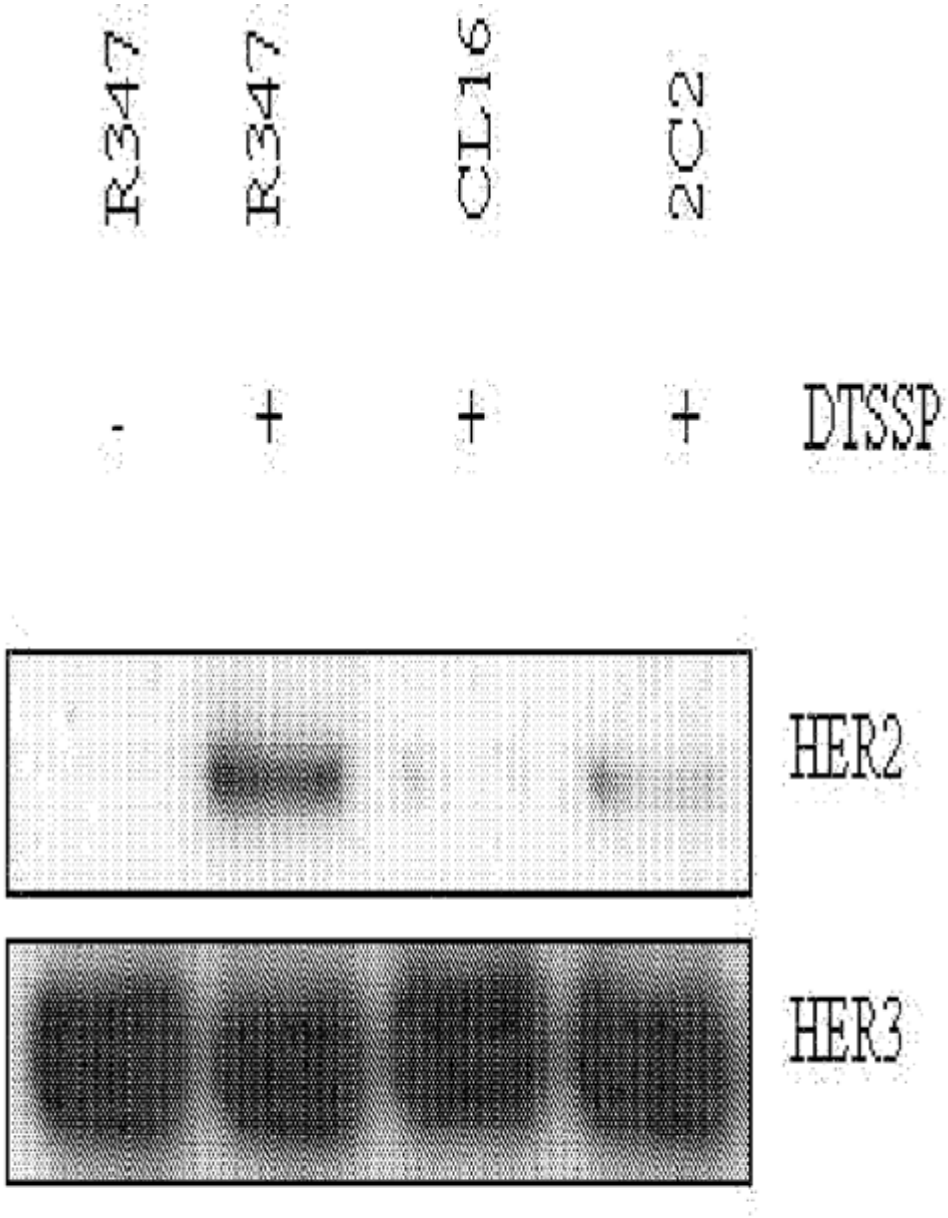
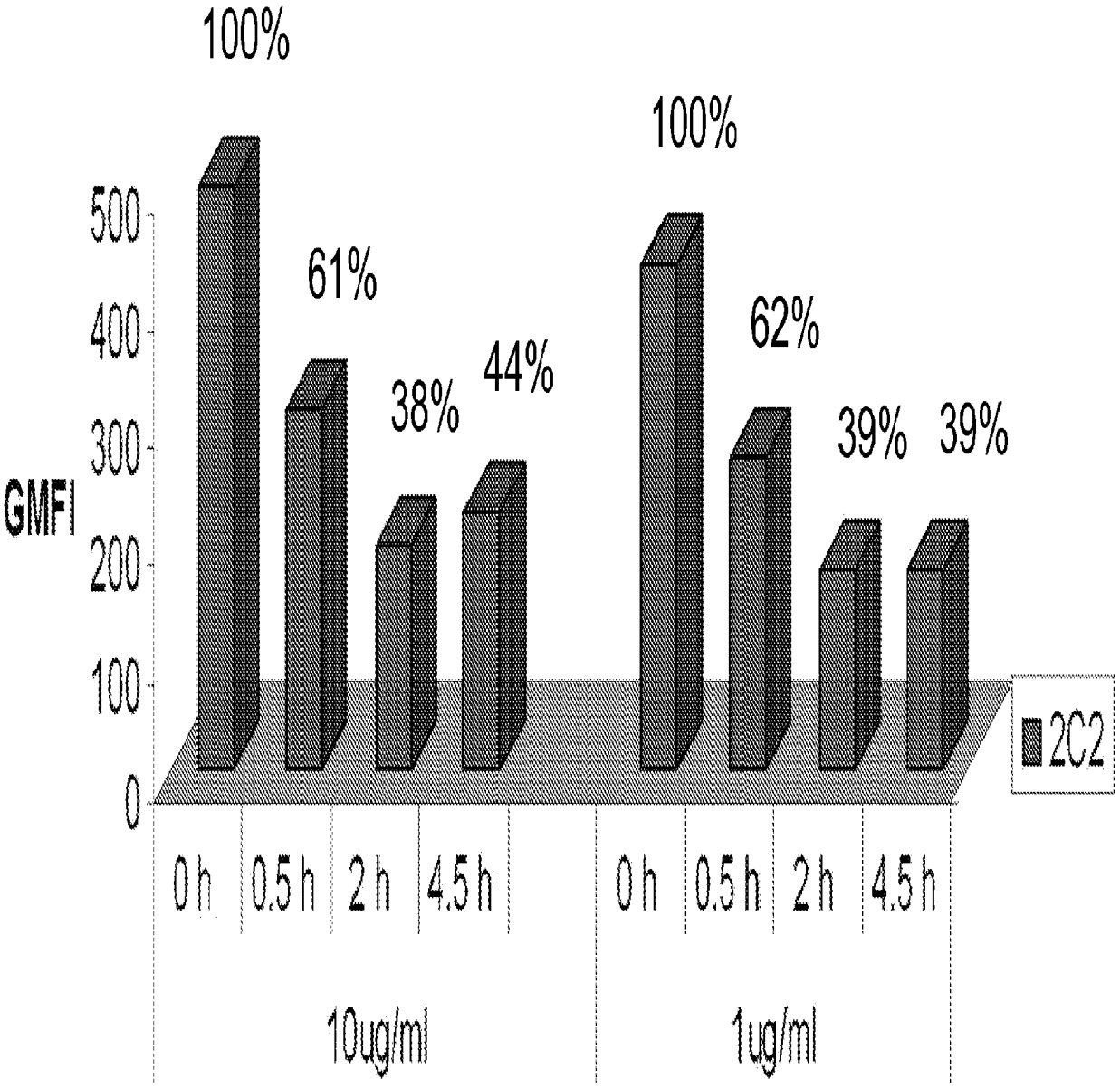


Fig. 14B



evolución temporal y concentraciones de AcM

Fig. 15A

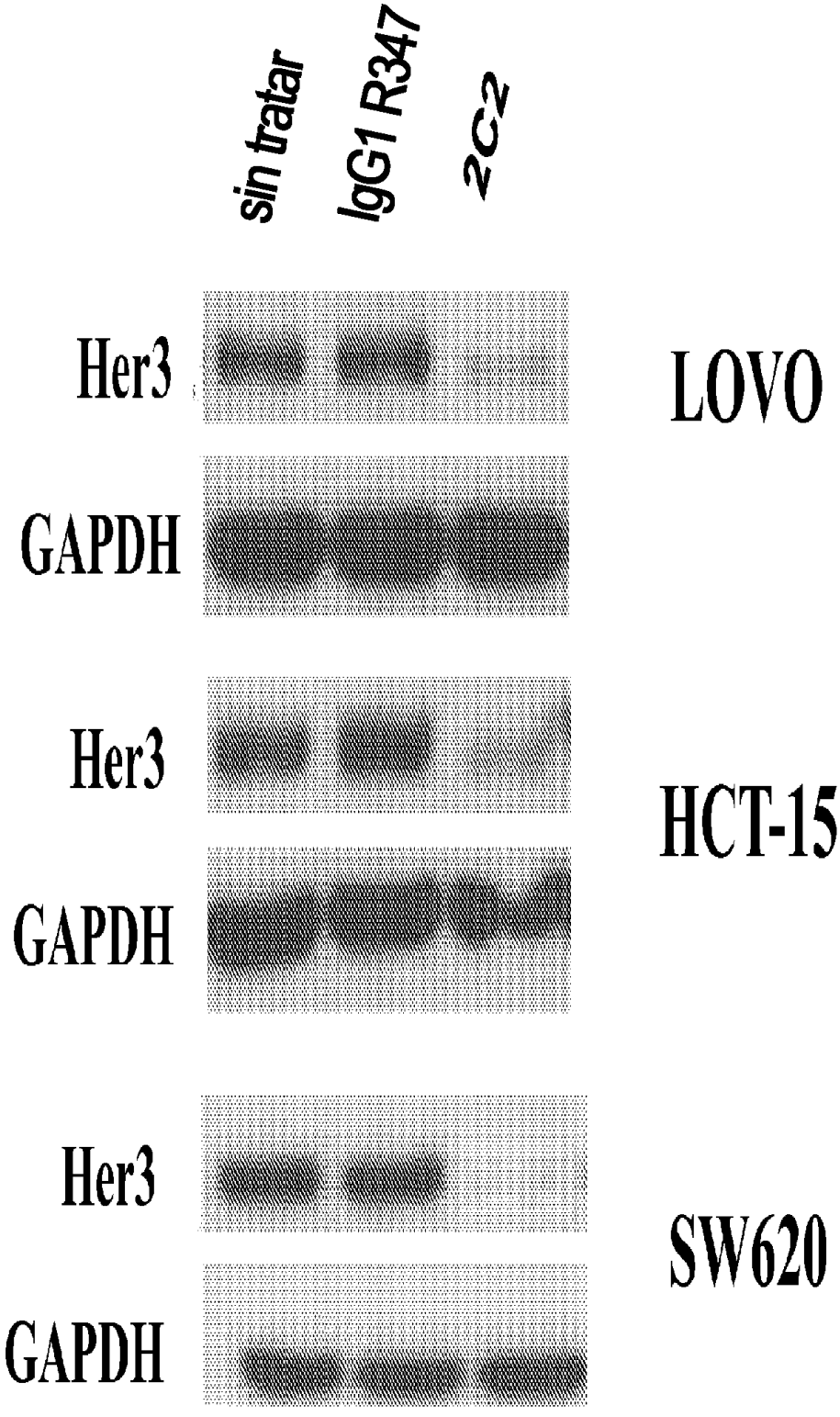

sin tratar
IgG1 R347
2C2
Her3
LOVO
GAPDH
Her3
HCT-15
GAPDH
Her3
SW620
GAPDH

Fig. 15B

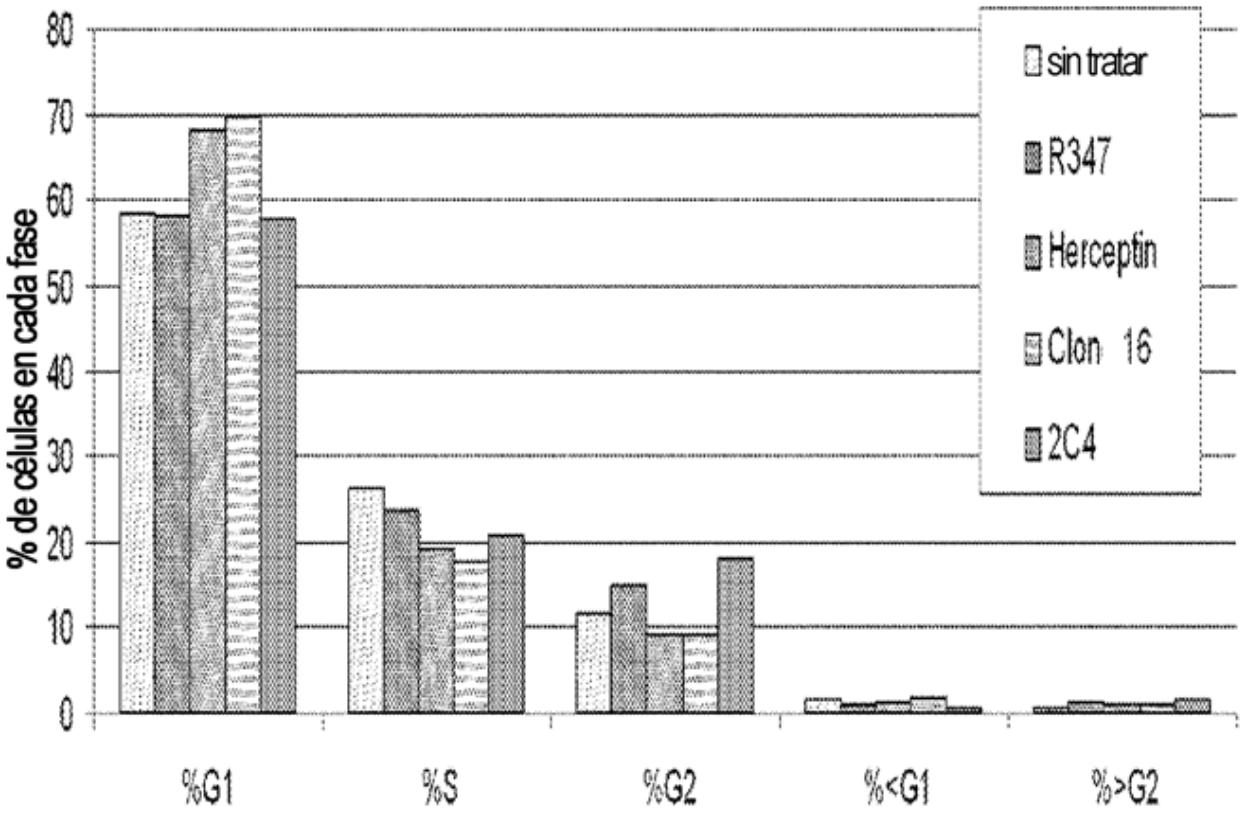

% de células en cada fase
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%G1
%S
%G2
%<G1
%>G2
sin tratar
R347
Herceptin
Clon 16
2C4

Fig. 16

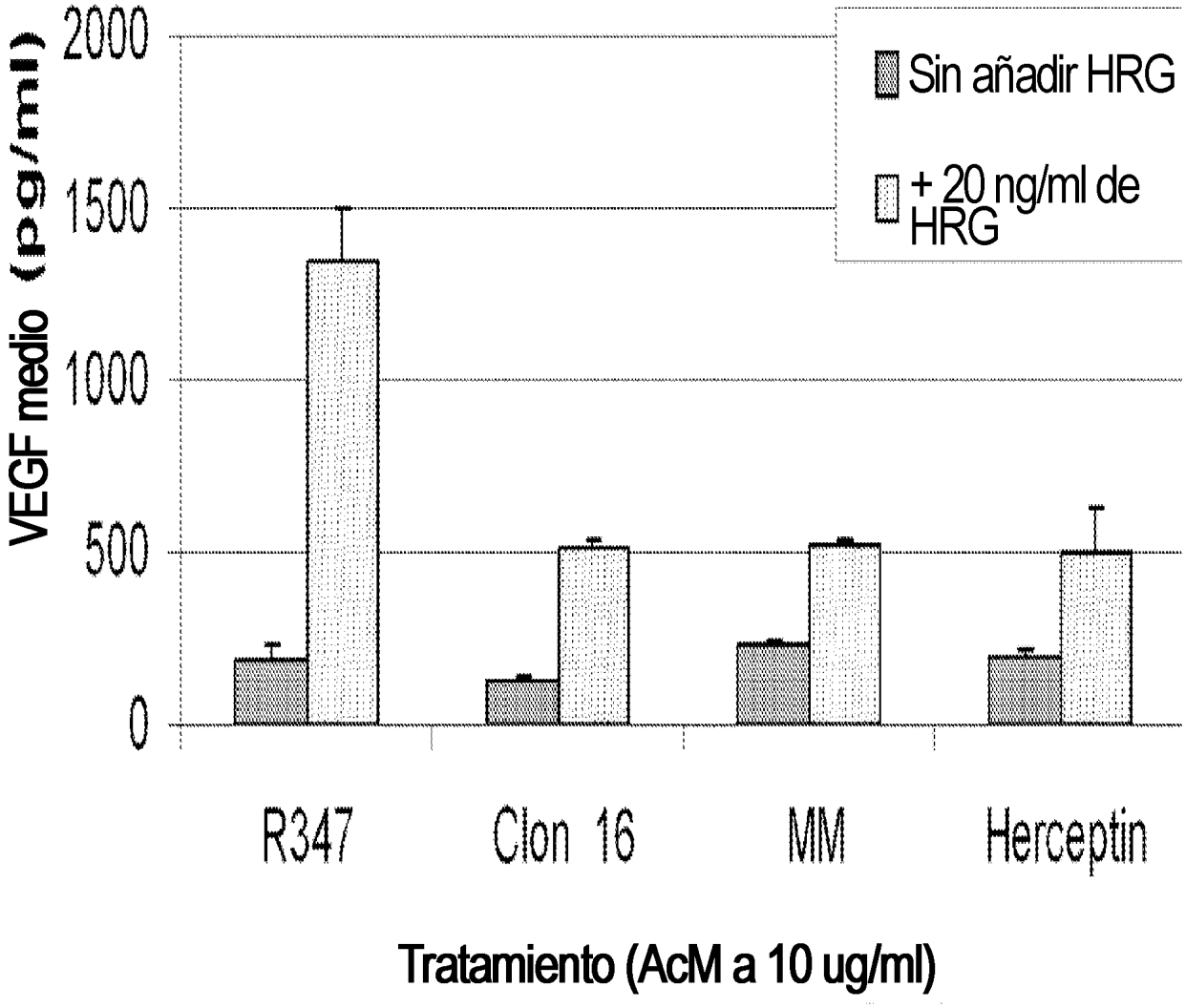

VEGF medio (pg/ml)
2000
1500
1000
500
0
Sin añadir HRG
+ 20 ng/ml de HRG
R347
Clon 16
MM
Herceptin
Tratamiento (AcM a 10 ug/ml)

Fig. 17A

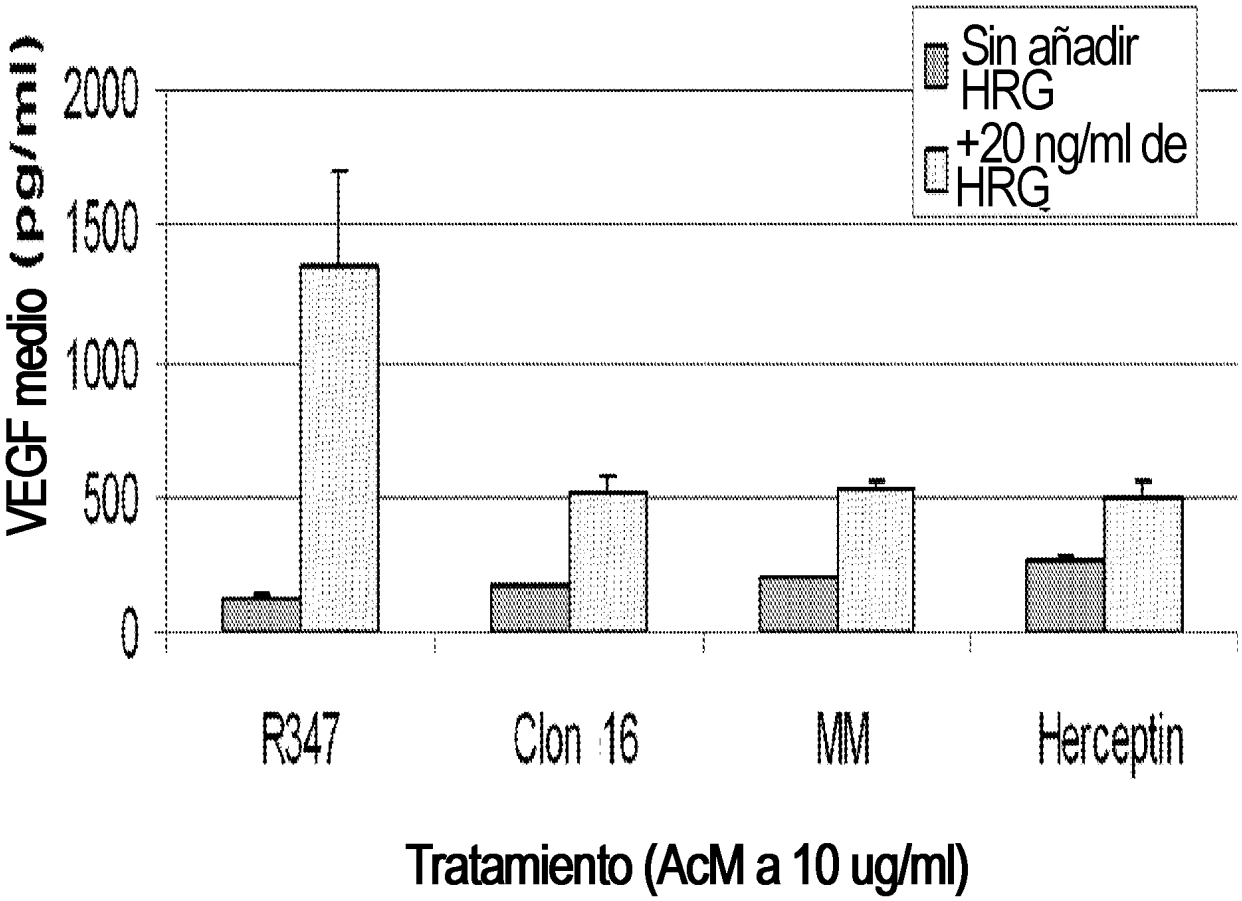

VEGF medio (pg/ml)
2000
1500
1000
500
0
Sin añadir HRG
+20 ng/ml de HRG
R347
Clon 16
MM
Herceptin
Tratamiento (AcM a 10 ug/ml)

Fig. 17B

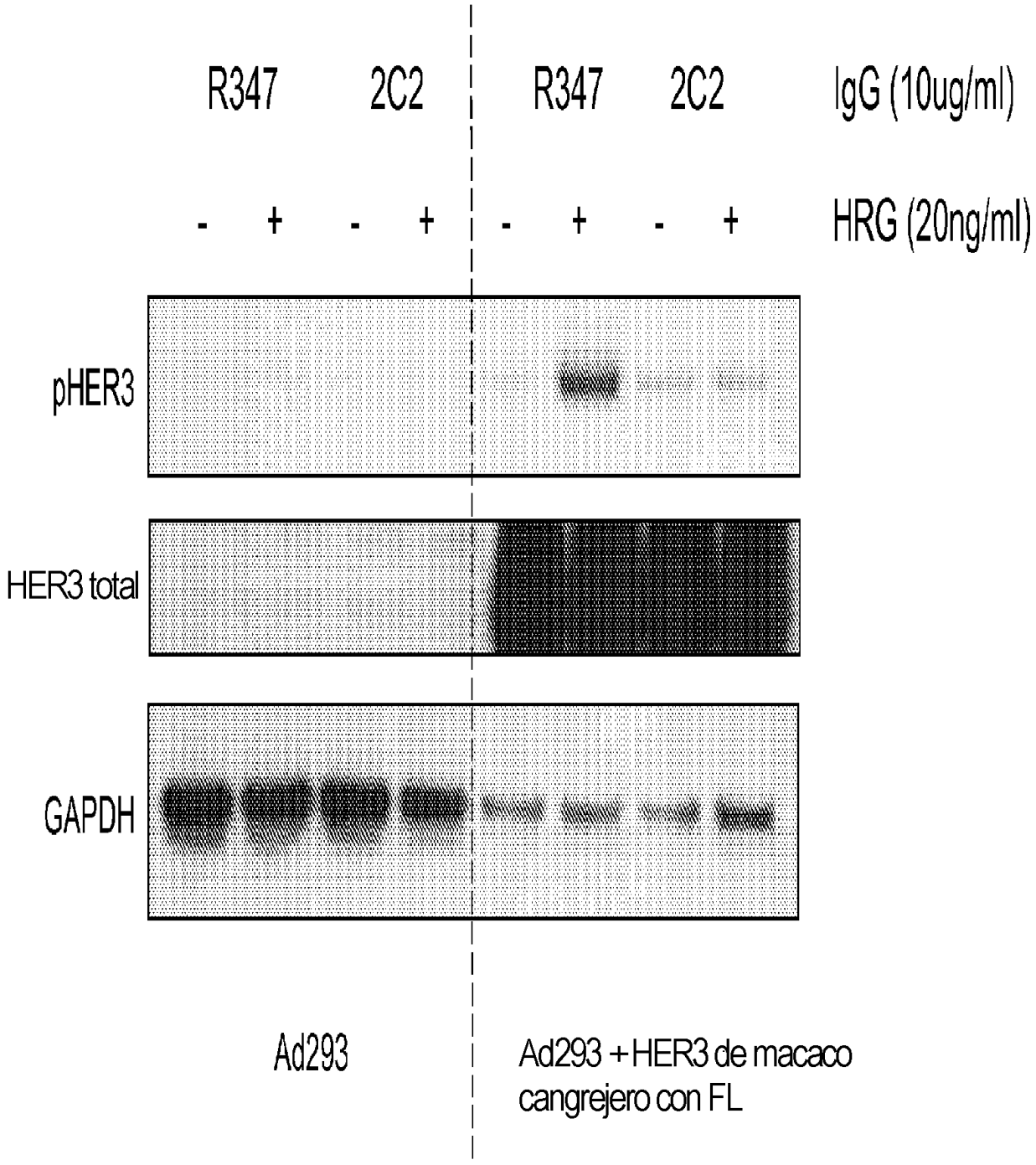

R347
2C2
R347
2C2
IgG (10ug/ml)
- + - + - + - +
HRG (20ng/ml)
pHER3
HER3 total
GAPDH
Ad293
Ad293 + HER3 de macaco cangrejero con FL

Fig. 18A

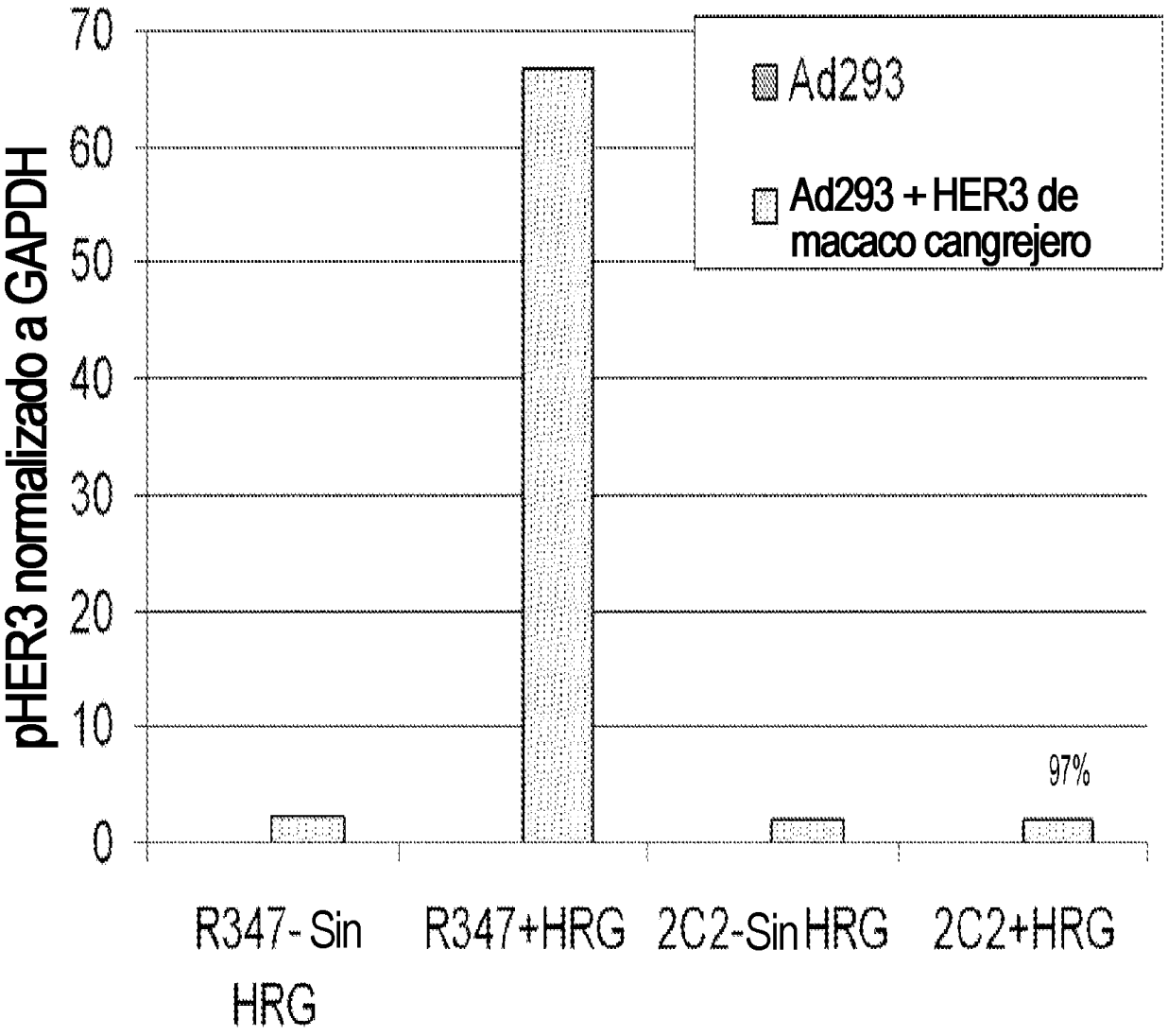

pHER3 normalizado a GAPDH
70
60
50
40
30
20
10
0
Ad293
Ad293 + HER3 de macaco cangrejero
97%
R347- Sin HRG
R347+HRG
2C2-Sin HRG
2C2+HRG

Fig. 18B

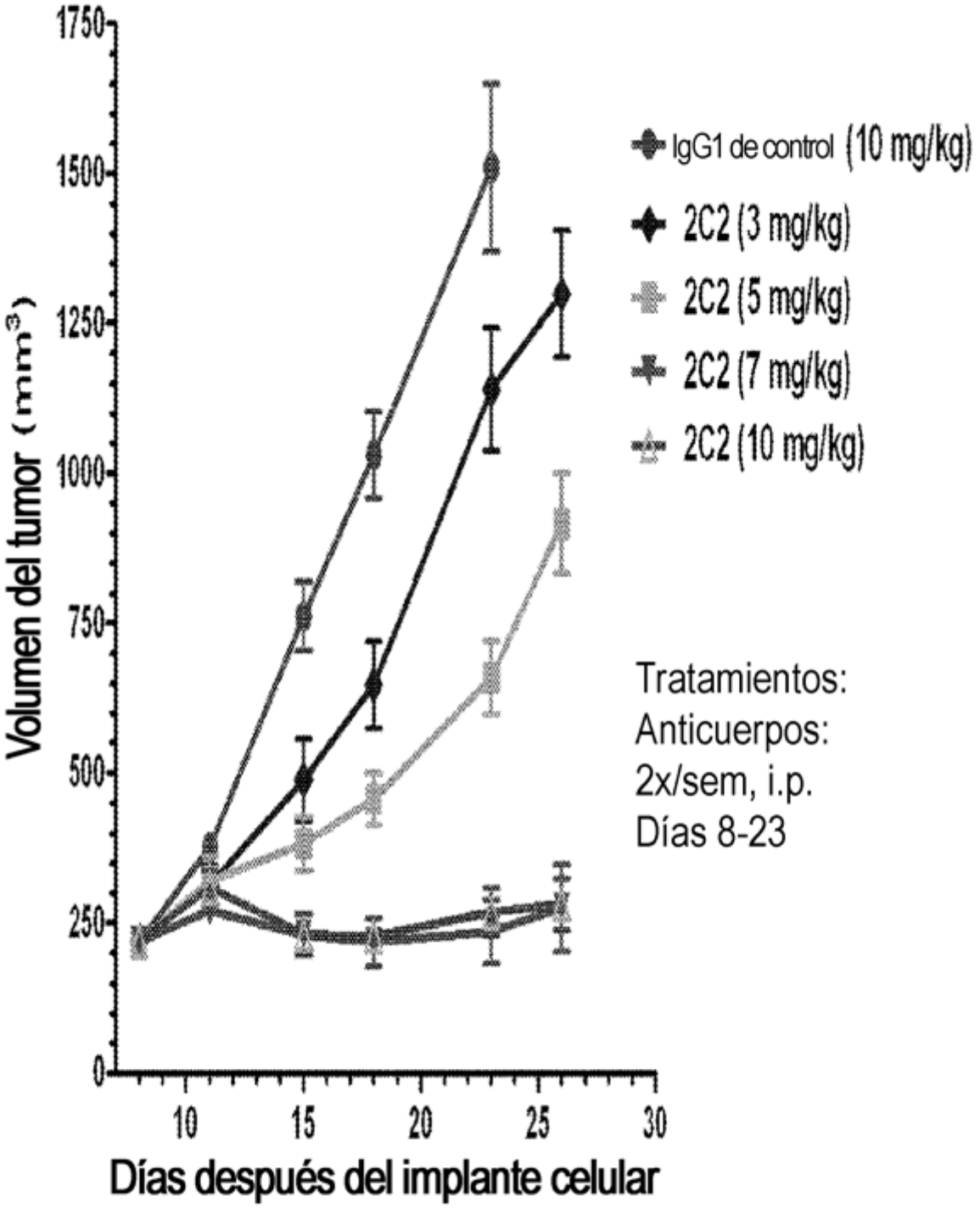

1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
Volumen del tumor (mm³)
10
15
20
25
30
Días después del implante celular
IgG1 de control (10 mg/kg)
2C2 (3 mg/kg)
2C2 (5 mg/kg)
2C2 (7 mg/kg)
2C2 (10 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 8-23

Fig. 19A

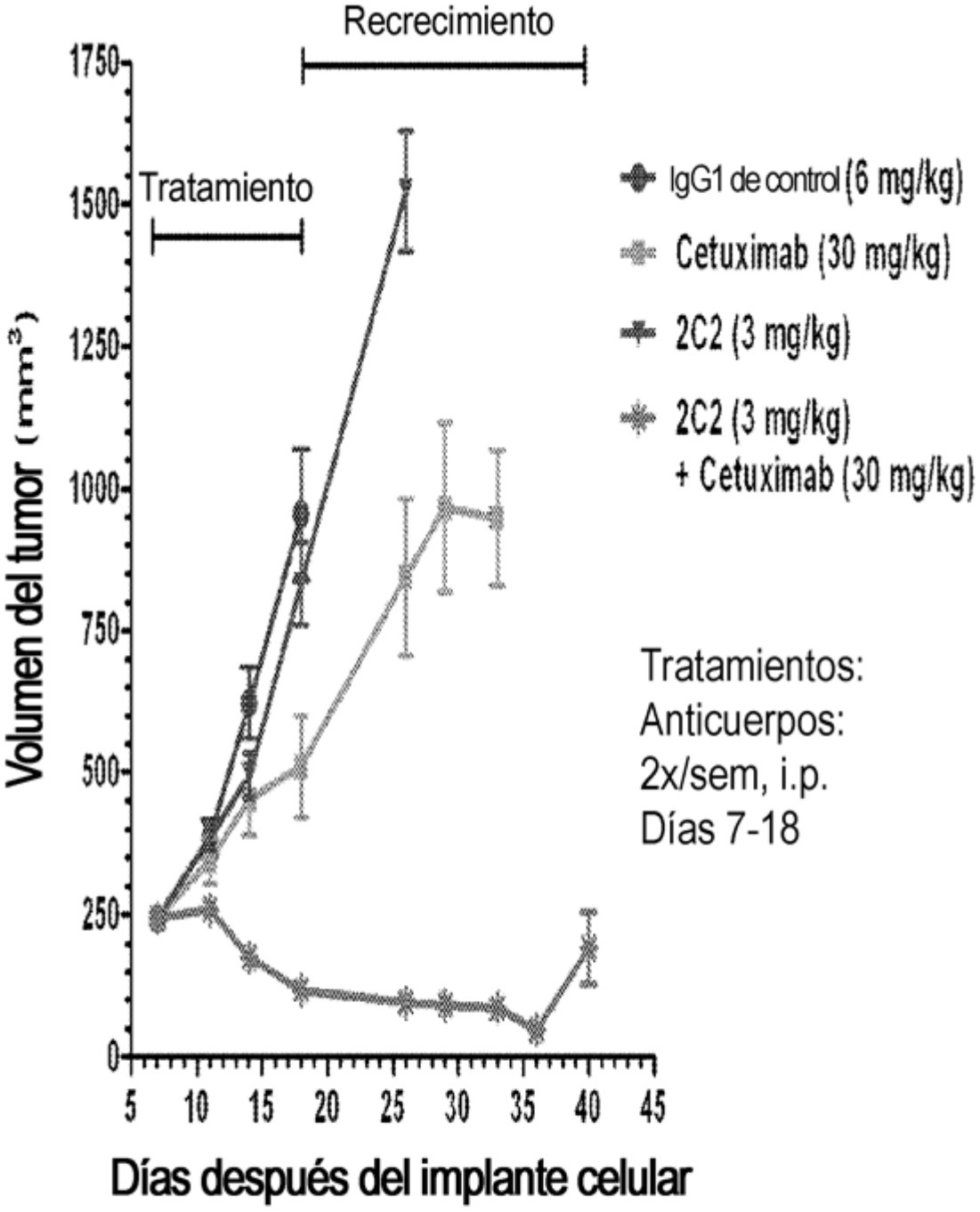

Recrecimiento
Tratamiento
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
Volumen del tumor (mm3)
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Días después del implante celular
IgG1 de control (6 mg/kg)
Cetuximab (30 mg/kg)
2C2 (3 mg/kg)
2C2 (3 mg/kg)
+ Cetuximab (30 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 7-18

Fig. 19B

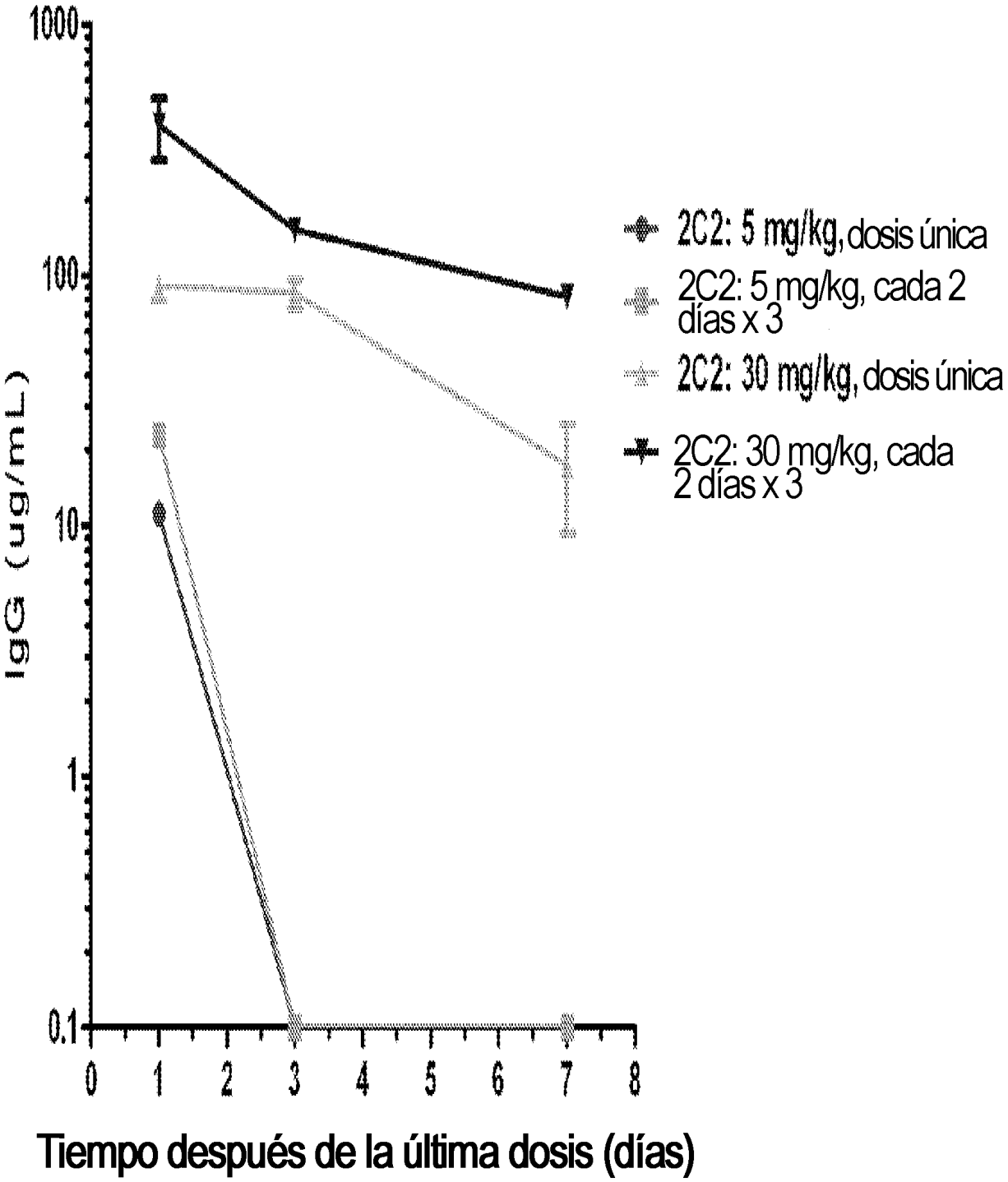

1000
100
10
1
0.1
IgG (ug/mL)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Tiempo después de la última dosis (días)
2C2: 5 mg/kg, dosis única
2C2: 5 mg/kg, cada 2 días x 3
2C2: 30 mg/kg, dosis única
2C2: 30 mg/kg, cada 2 días x 3

Fig. 20

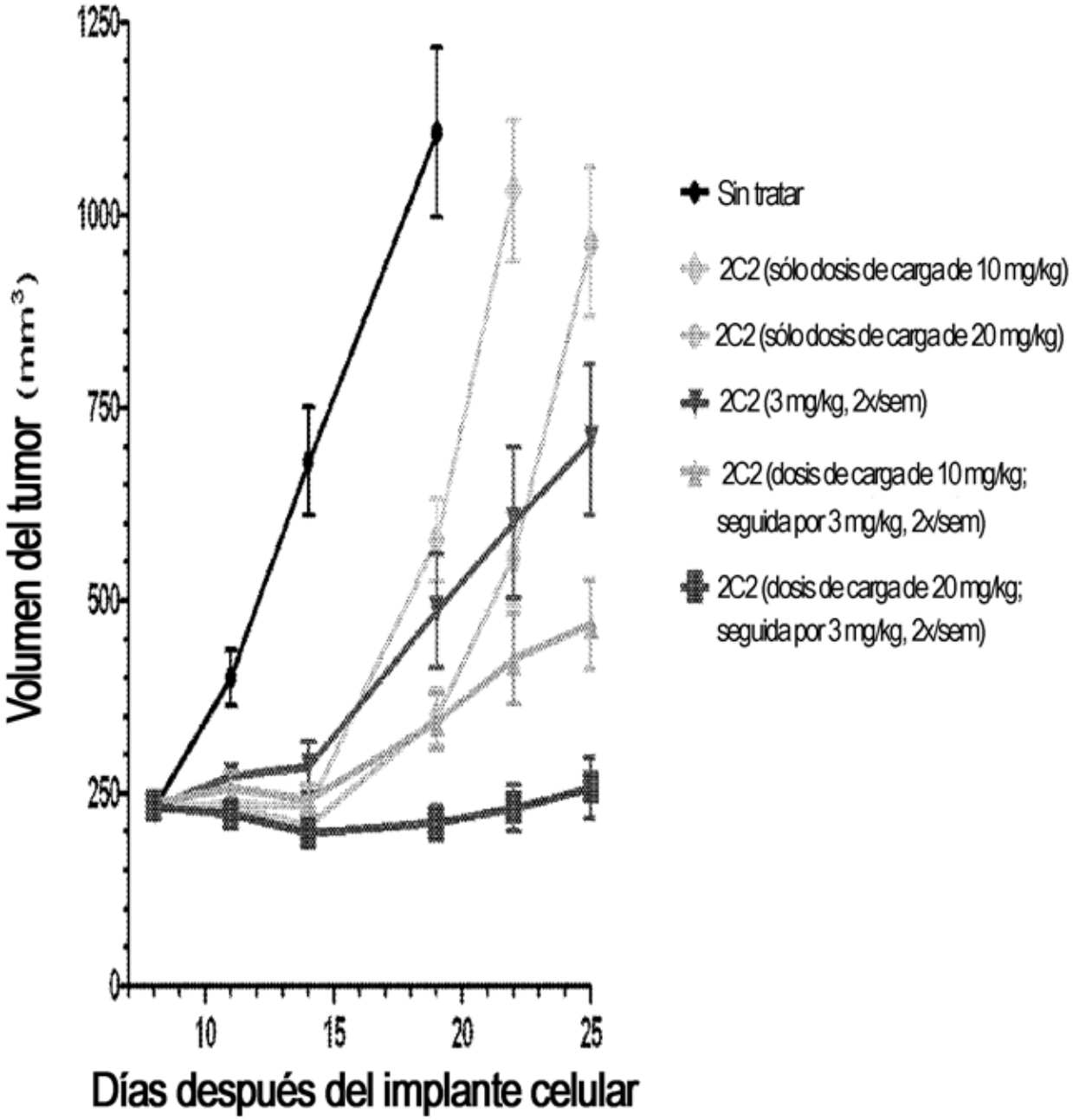

1250
1000
750
500
250
0
Volumen del tumor (mm3)
10
15
20
25
Días después del implante celular
Sin tratar
2C2 (sólo dosis de carga de 10 mg/kg)
2C2 (sólo dosis de carga de 20 mg/kg)
2C2 (3 mg/kg, 2x/sem)
2C2 (dosis de carga de 10 mg/kg; seguida por 3 mg/kg, 2x/sem)
2C2 (dosis de carga de 20 mg/kg; seguida por 3 mg/kg, 2x/sem)

Fig. 21

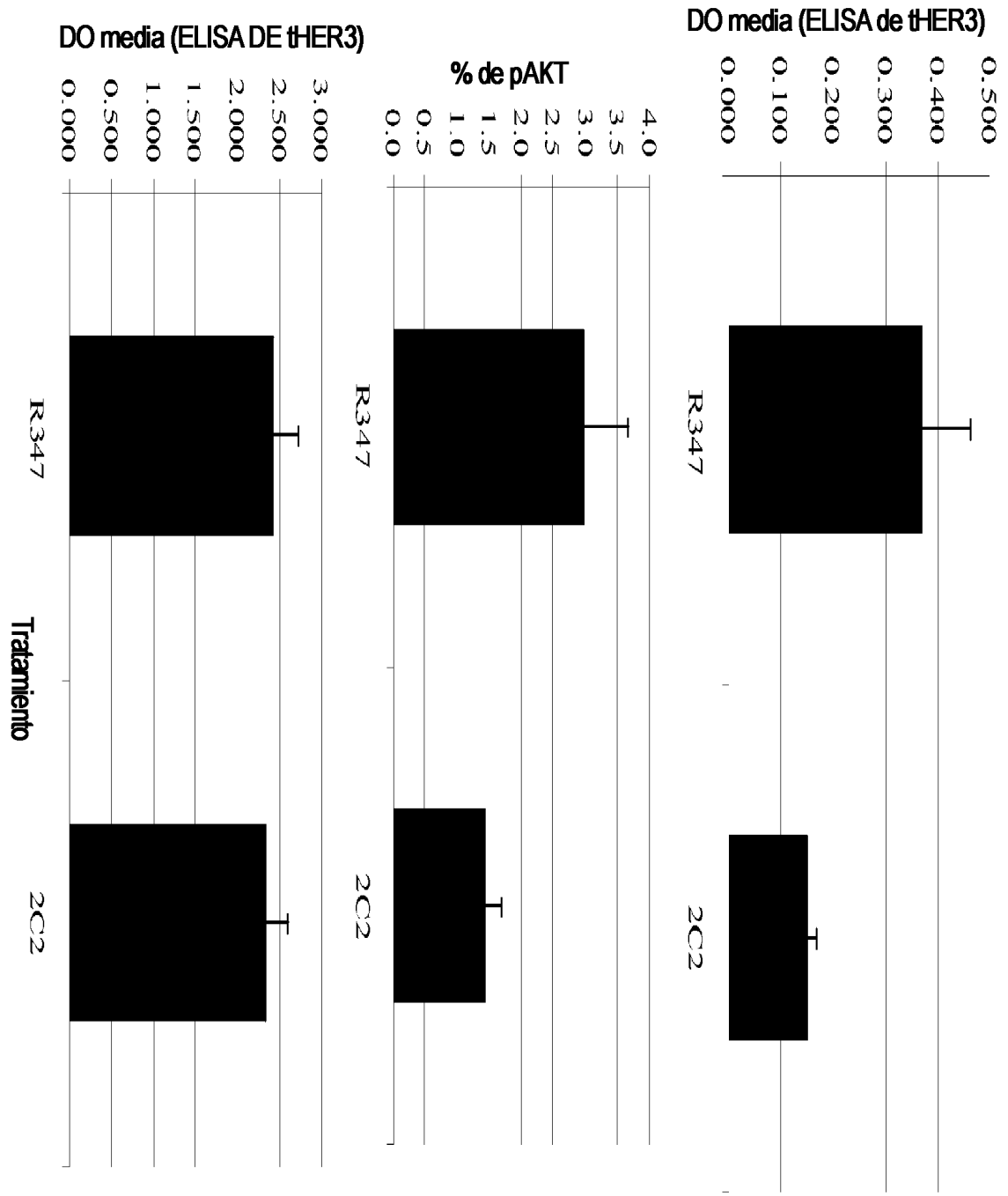

DO media (ELISA de tHER3)
0.000
0.100
0.200
0.300
0.400
0.500
R347
2C2
% de pAKT
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
R347
2C2
DO media (ELISA DE tHER3)
0.000
0.500
1.000
1.500
2.000
2.500
3.000
R347
2C2
Tratamiento

Fig. 22

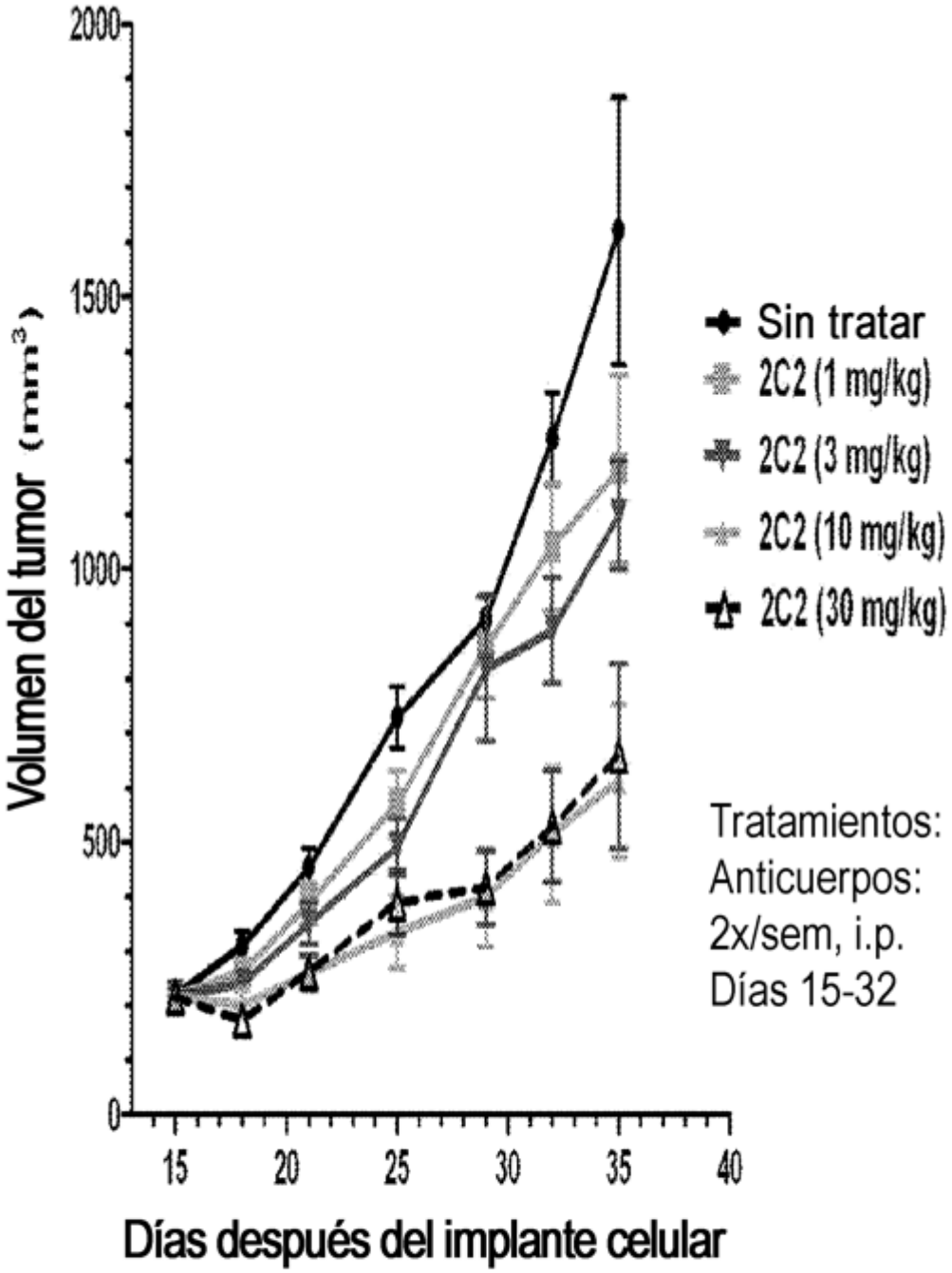

2000
1500
1000
500
0
Volumen del tumor (mm3)
15
20
25
30
35
40
Días después del implante celular
Sin tratar
2C2 (1 mg/kg)
2C2 (3 mg/kg)
2C2 (10 mg/kg)
2C2 (30 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 15-32

Fig. 23A

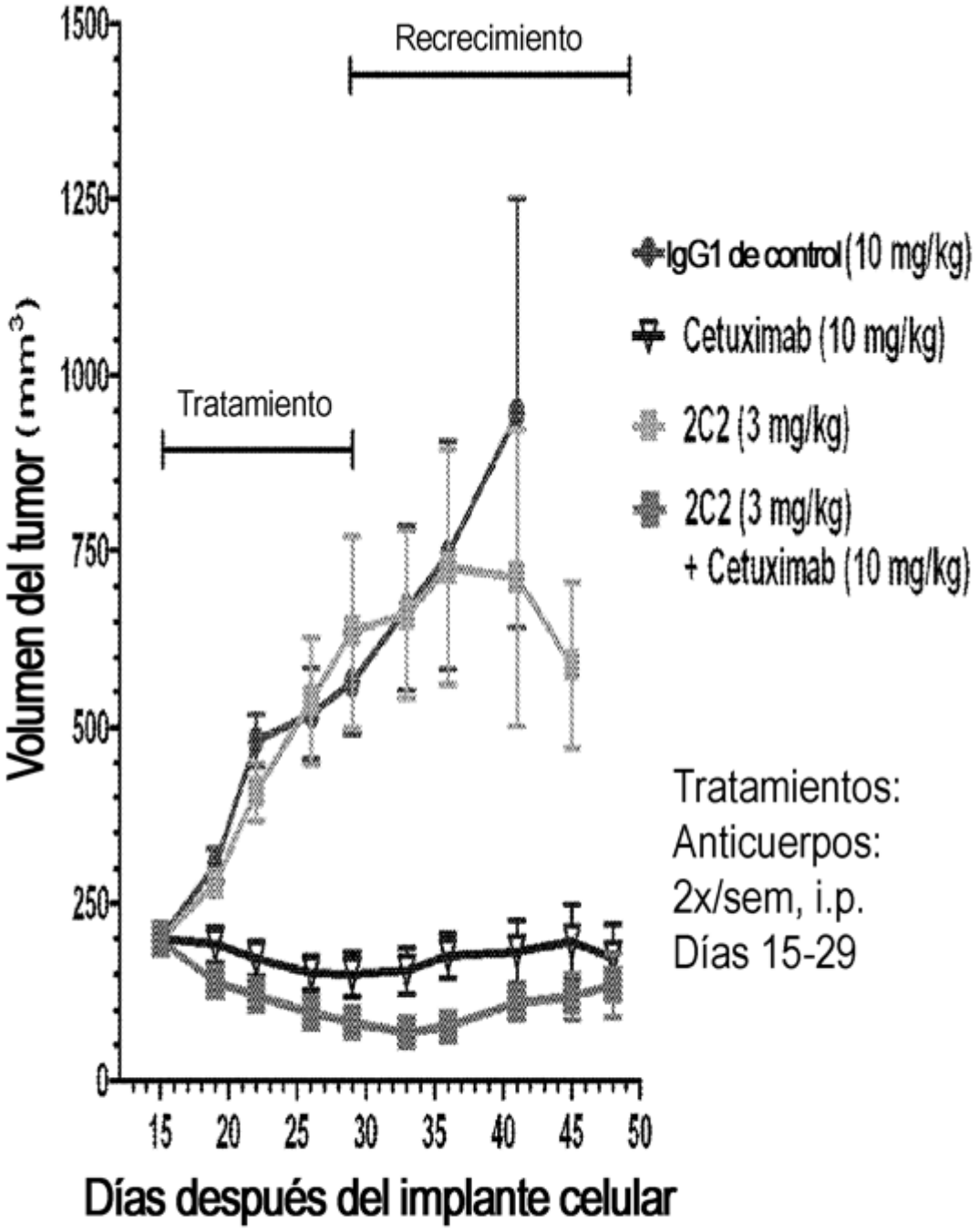

Recrecimiento
Tratamiento
Volumen del tumor (mm3)
1500
1250
1000
750
500
250
0
15
20
25
30
35
40
45
50
Días después del implante celular
IgG1 de control (10 mg/kg)
Cetuximab (10 mg/kg)
2C2 (3 mg/kg)
2C2 (3 mg/kg)
+ Cetuximab (10 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 15-29

Fig. 23B

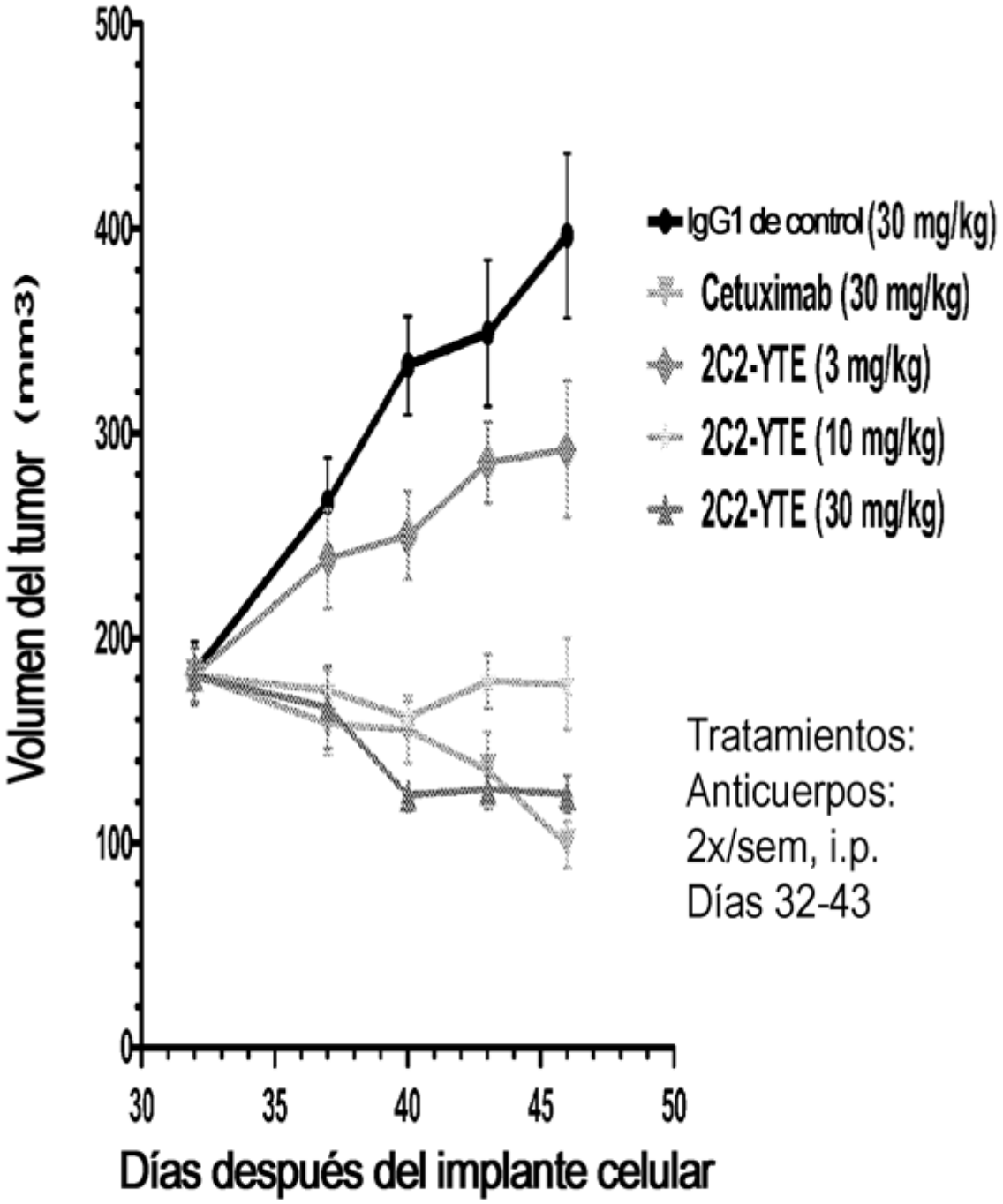

Volumen del tumor (mm3)
500
400
300
200
100
0
30
35
40
45
50
Días después del implante celular
IgG1 de control (30 mg/kg)
Cetuximab (30 mg/kg)
2C2-YTE (3 mg/kg)
2C2-YTE (10 mg/kg)
2C2-YTE (30 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 32-43

Fig. 24

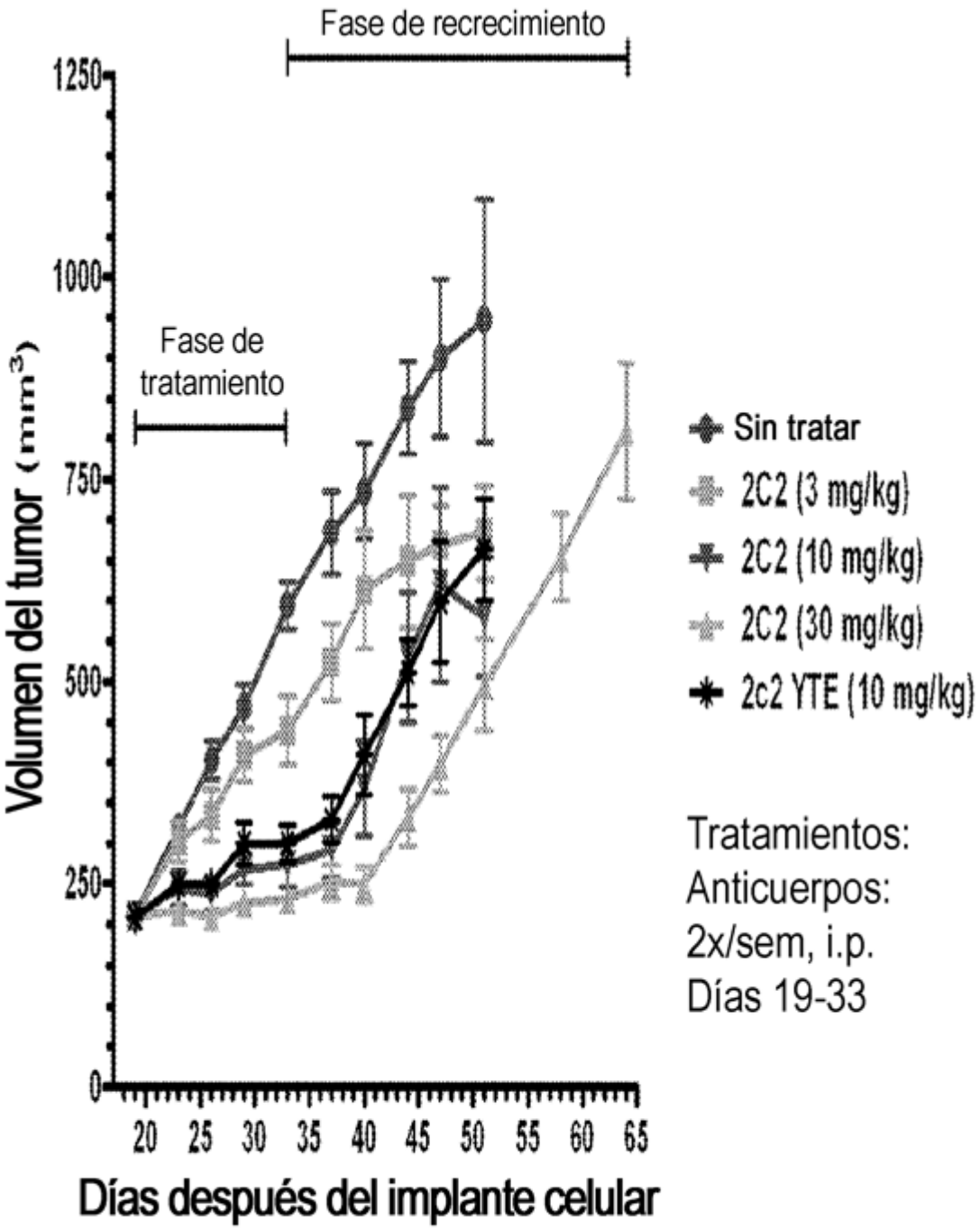

Fase de recrecimiento
Fase de tratamiento
Volumen del tumor (mm³)
1250
1000
750
500
250
0
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
Días después del implante celular
Sin tratar
2C2 (3 mg/kg)
2C2 (10 mg/kg)
2C2 (30 mg/kg)
2c2 YTE (10 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 19-33

Fig. 25A

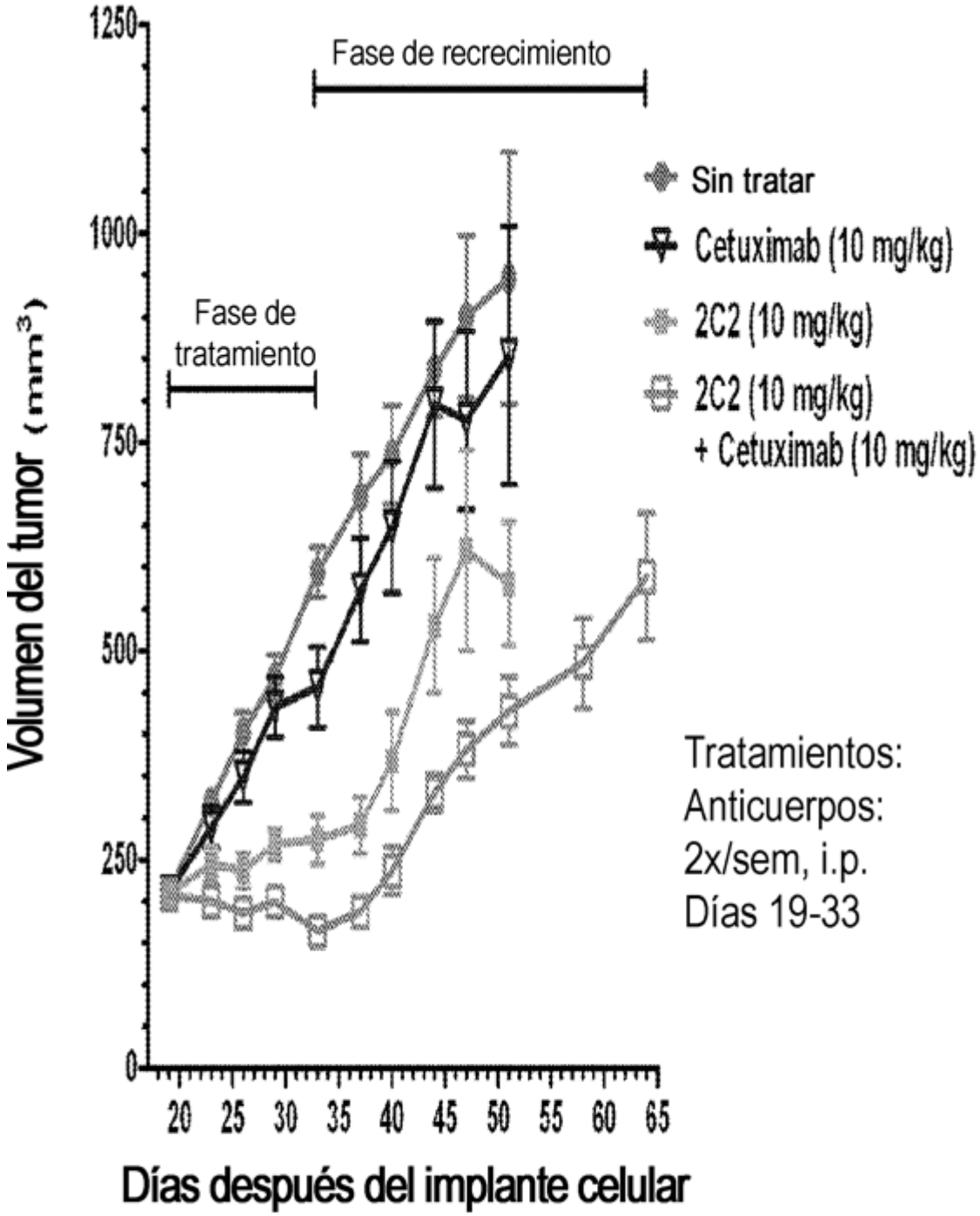

Fase de recrecimiento
Fase de tratamiento
Sin tratar
Cetuximab (10 mg/kg)
2C2 (10 mg/kg)
2C2 (10 mg/kg) + Cetuximab (10 mg/kg)
Volumen del tumor (mm³)
1250
1000
750
500
250
0
20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
Días después del implante celular
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 19-33

Fig. 25B

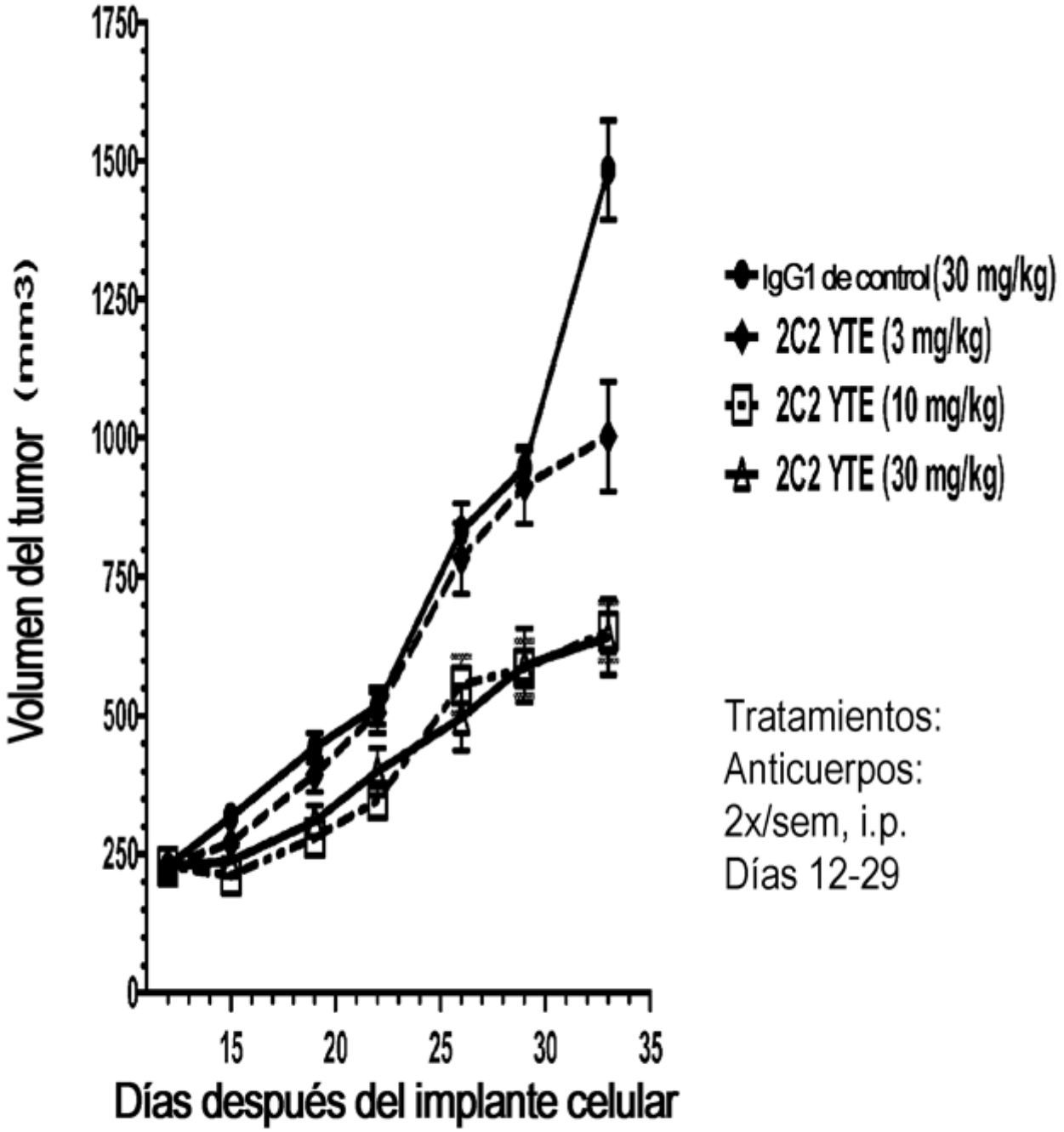

Volumen del tumor (mm3)
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
15
20
25
30
35
Días después del implante celular
IgG1 de control (30 mg/kg)
2C2 YTE (3 mg/kg)
2C2 YTE (10 mg/kg)
2C2 YTE (30 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 12-29

Fig. 26

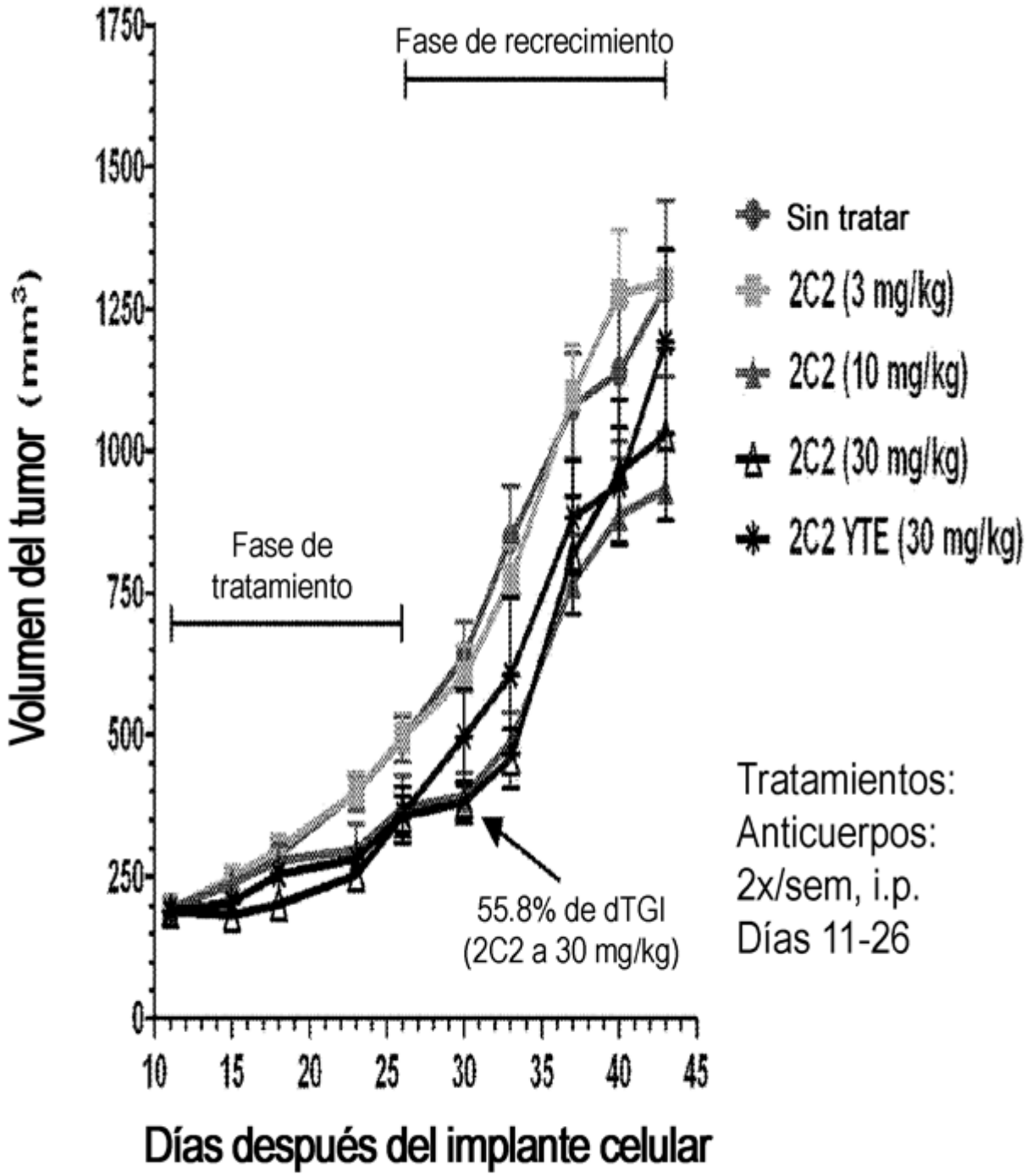

Fase de recrecimiento
Fase de tratamiento
Sin tratar
2C2 (3 mg/kg)
2C2 (10 mg/kg)
2C2 (30 mg/kg)
2C2 YTE (30 mg/kg)
55.8% de dTGI
(2C2 a 30 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 11-26
Volumen del tumor (mm3)
Días después del implante celular
0
250
500
750
1000
1250
1500
1750
10
15
20
25
30
35
40
45

Fig. 27

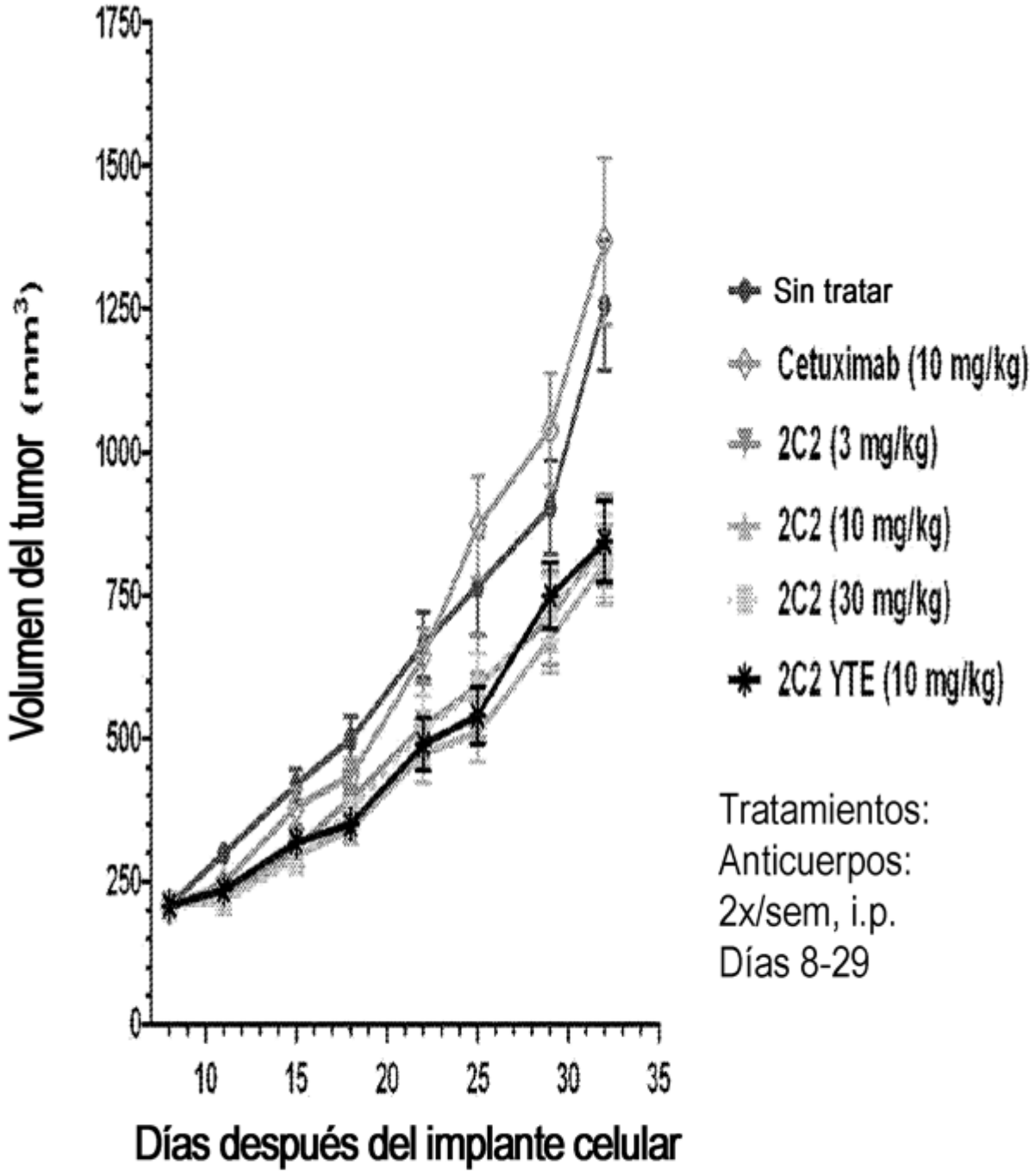

Volumen del tumor (mm³)
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
10
15
20
25
30
35
Días después del implante celular
Sin tratar
Cetuximab (10 mg/kg)
2C2 (3 mg/kg)
2C2 (10 mg/kg)
2C2 (30 mg/kg)
2C2 YTE (10 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 8-29

Fig. 28

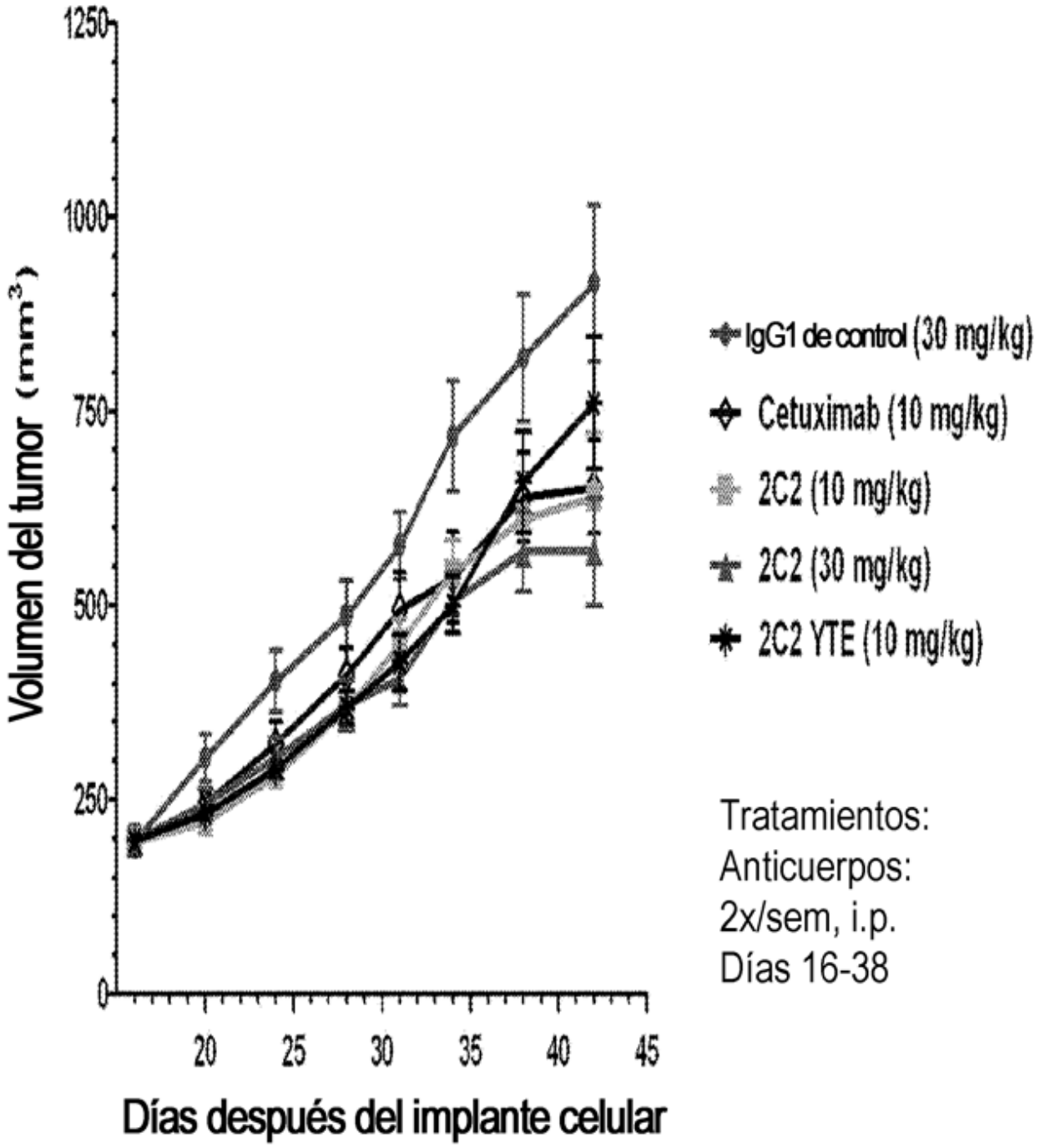

1250
1000
750
500
250
0
Volumen del tumor (mm3)
20
25
30
35
40
45
Días después del implante celular
IgG1 de control (30 mg/kg)
Cetuximab (10 mg/kg)
2C2 (10 mg/kg)
2C2 (30 mg/kg)
2C2 YTE (10 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 16-38

Fig. 29

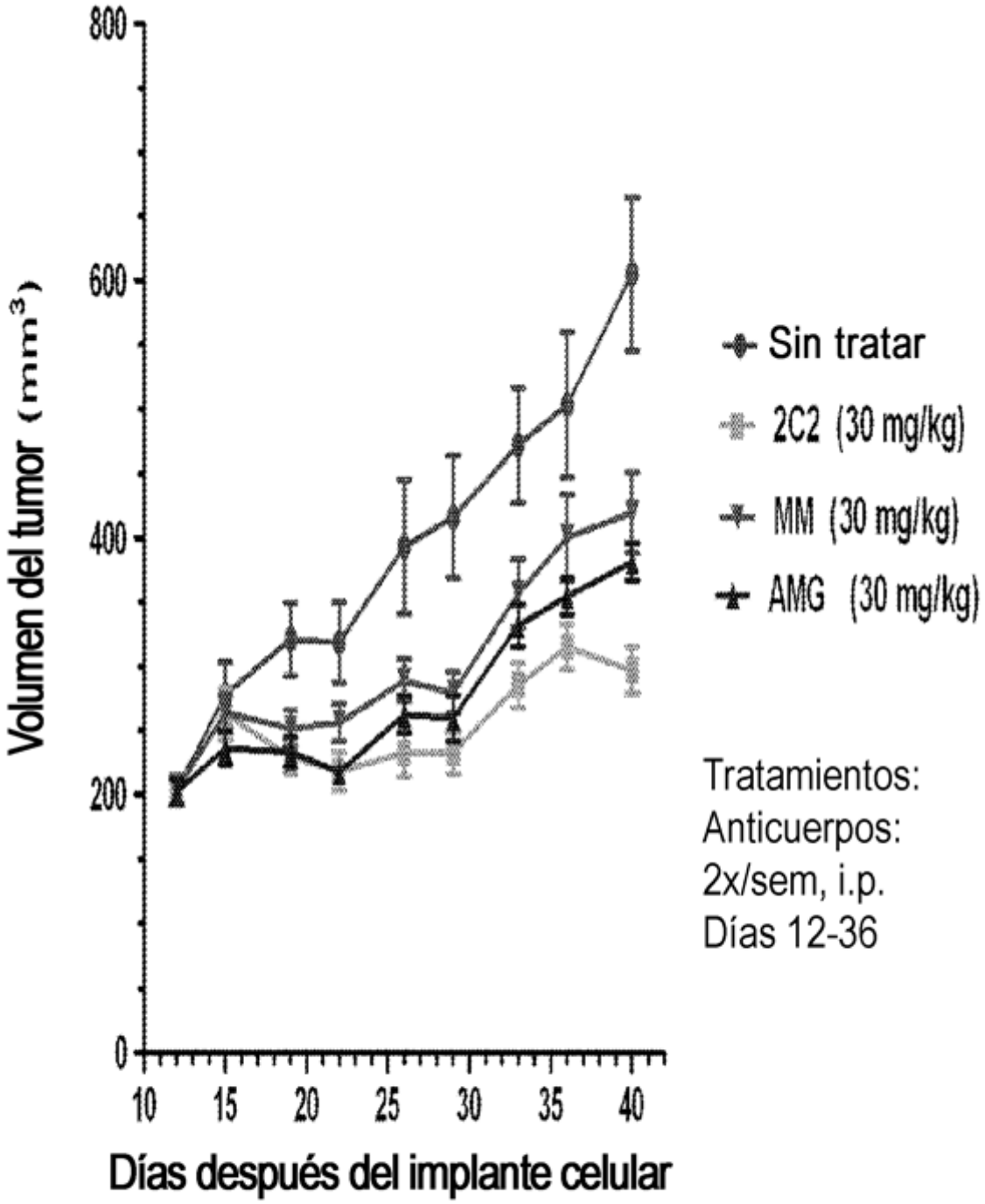

800
600
400
200
0
Volumen del tumor (mm³)
10
15
20
25
30
35
40
Días después del implante celular
Sin tratar
2C2 (30 mg/kg)
MM (30 mg/kg)
AMG (30 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 12-36

Fig. 30

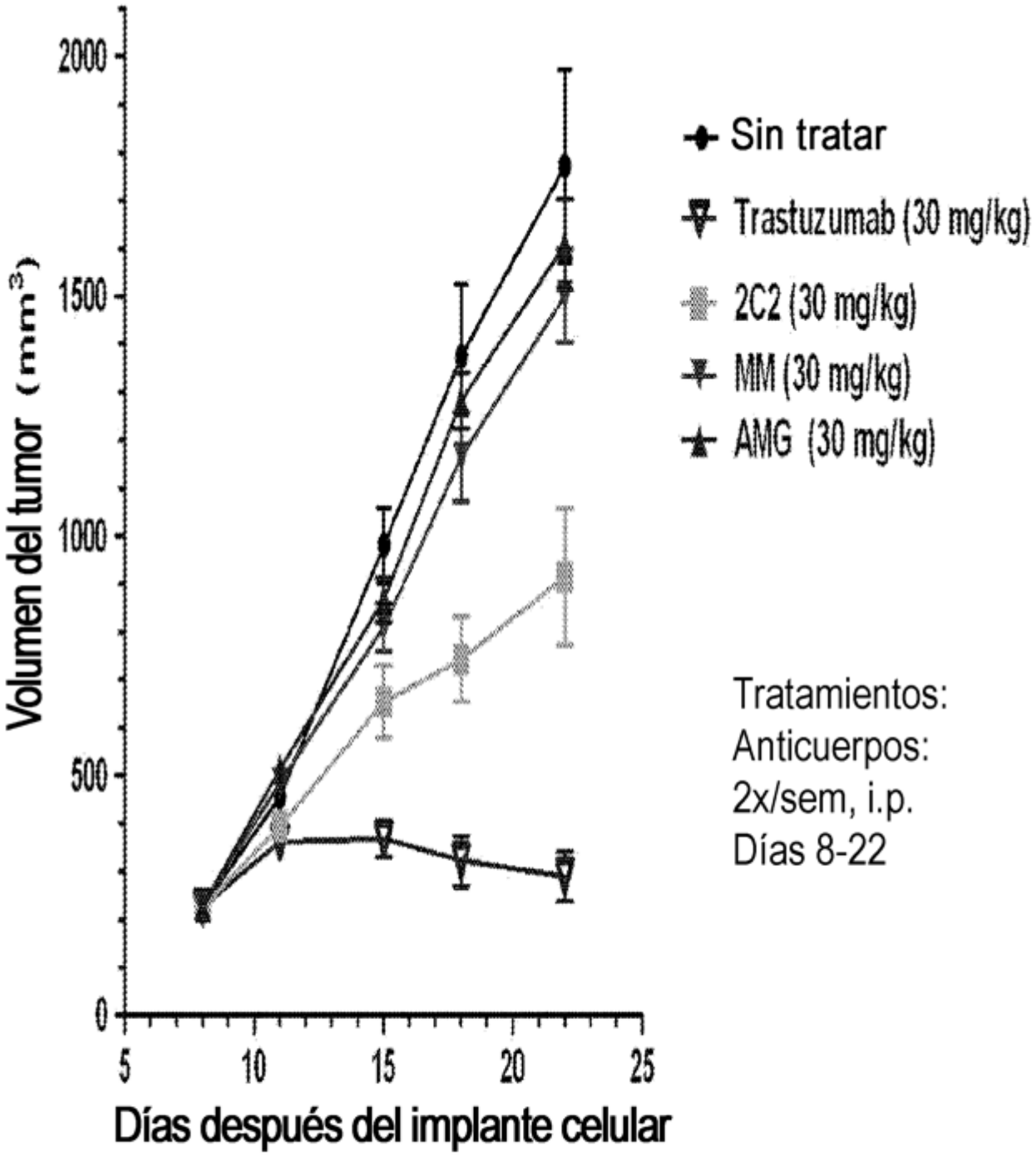

Volumen del tumor (mm3)
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
Días después del implante celular
Sin tratar
Trastuzumab (30 mg/kg)
2C2 (30 mg/kg)
MM (30 mg/kg)
AMG (30 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 8-22

Fig. 31A

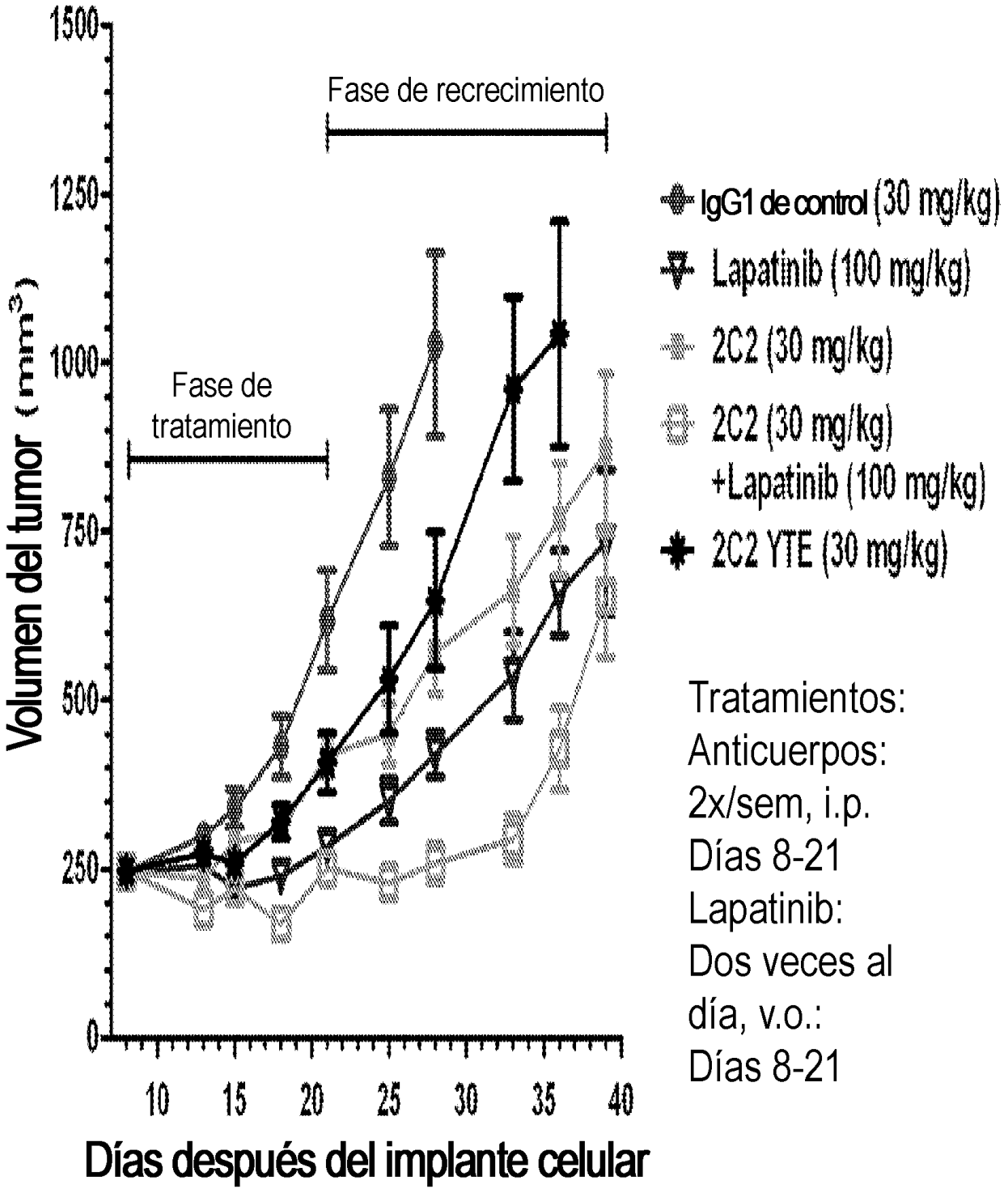

1500
1250
1000
750
500
250
0
Volumen del tumor (mm3)
Fase de recrecimiento
Fase de tratamiento
10
15
20
25
30
35
40
Días después del implante celular
IgG1 de control (30 mg/kg)
Lapatinib (100 mg/kg)
2C2 (30 mg/kg)
2C2 (30 mg/kg) +Lapatinib (100 mg/kg)
2C2 YTE (30 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 8-21
Lapatinib:
Dos veces al día, v.o.:
Días 8-21

Fig. 31B

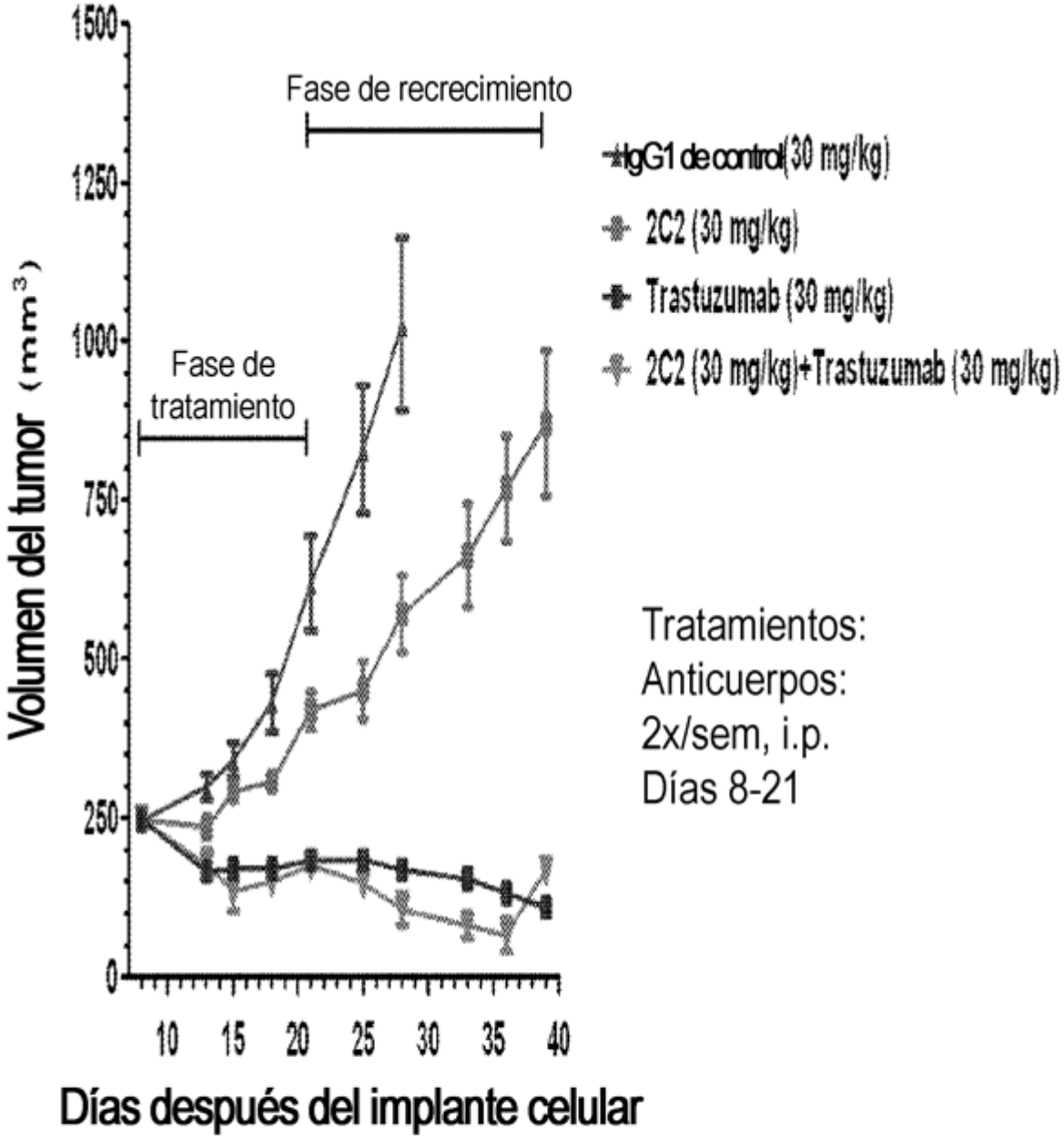

Fase de recrecimiento
Fase de tratamiento
IgG1 de control (30 mg/kg)
2C2 (30 mg/kg)
Trastuzumab (30 mg/kg)
2C2 (30 mg/kg)+Trastuzumab (30 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 8-21
Volumen del tumor (mm³)
Días después del implante celular
1500
1250
1000
750
500
250
0
10
15
20
25
30
35
40

Fig. 31C

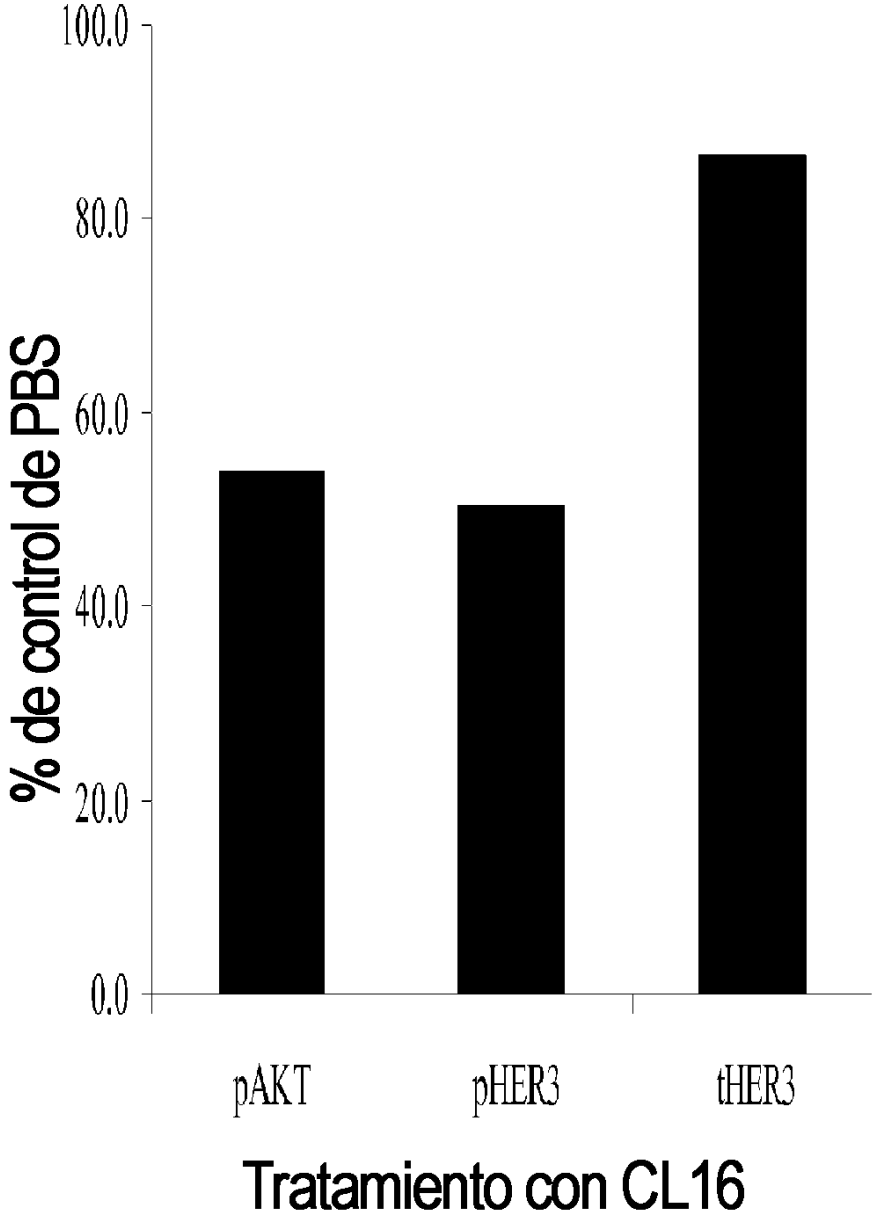

100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
% de control de PBS
pAKT
pHER3
tHER3
Tratamiento con CL16

Fig. 32

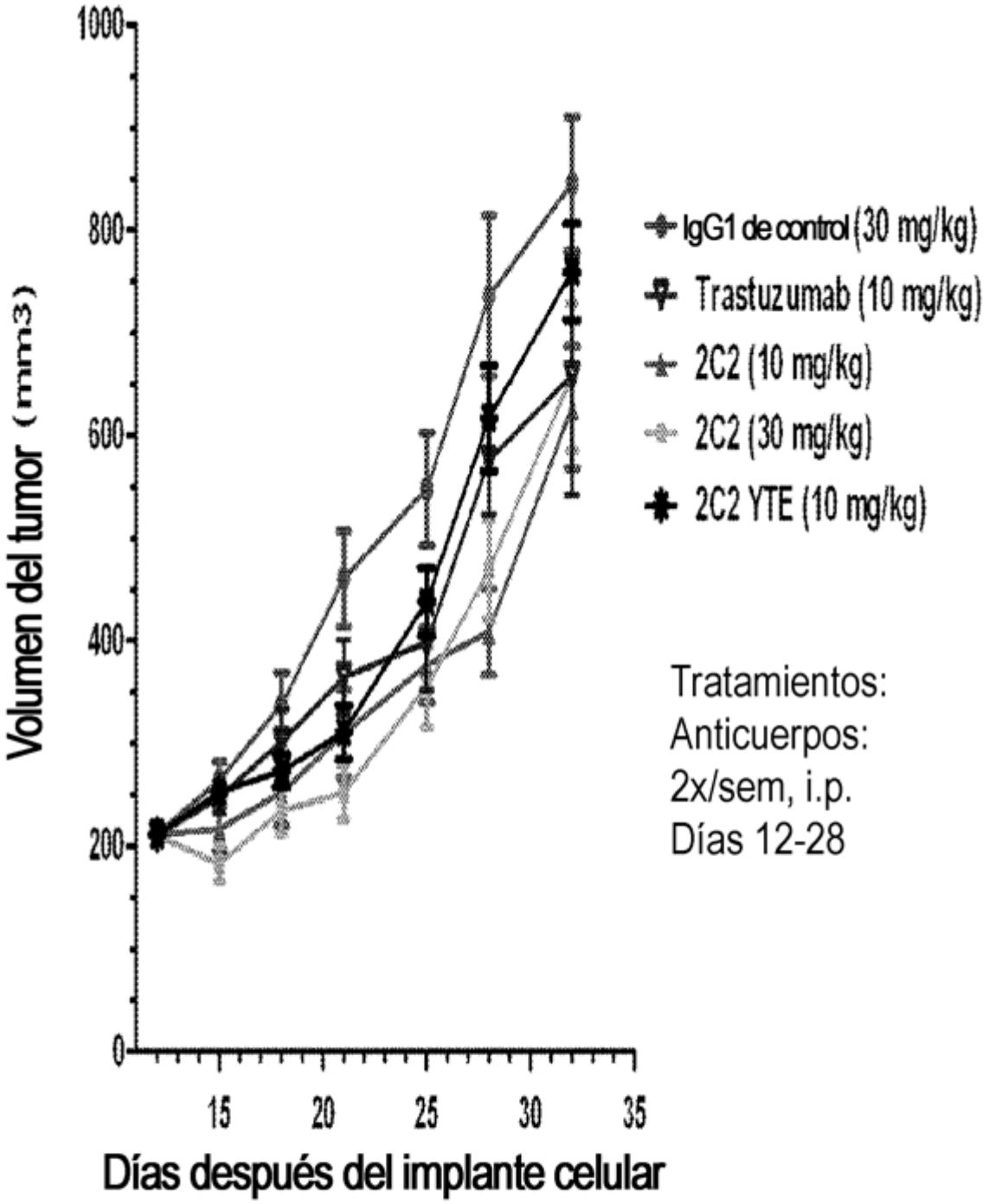

1000
800
600
400
200
0
Volumen del tumor (mm3)
15
20
25
30
35
Días después del implante celular
IgG1 de control (30 mg/kg)
Trastuzumab (10 mg/kg)
2C2 (10 mg/kg)
2C2 (30 mg/kg)
2C2 YTE (10 mg/kg)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 12-28

Fig. 33A

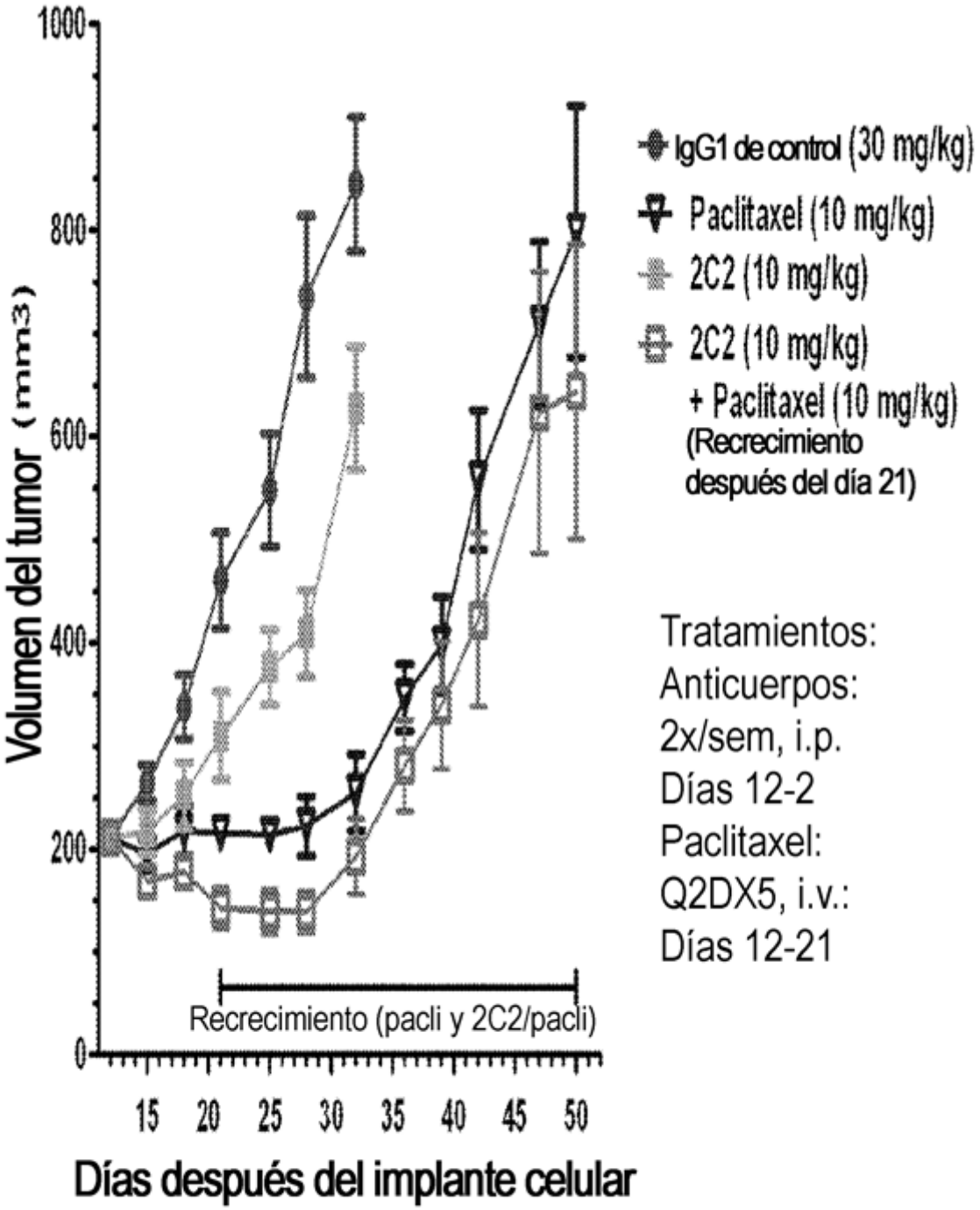

1000
800
600
400
200
0
Volumen del tumor (mm3)
15
20
25
30
35
40
45
50
Días después del implante celular
Recrecimiento (pacli y 2C2/pacli)
IgG1 de control (30 mg/kg)
Paclitaxel (10 mg/kg)
2C2 (10 mg/kg)
2C2 (10 mg/kg)
+ Paclitaxel (10 mg/kg)
(Recrecimiento
después del día 21)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 12-2
Paclitaxel:
Q2DX5, i.v.:
Días 12-21

Fig. 33B

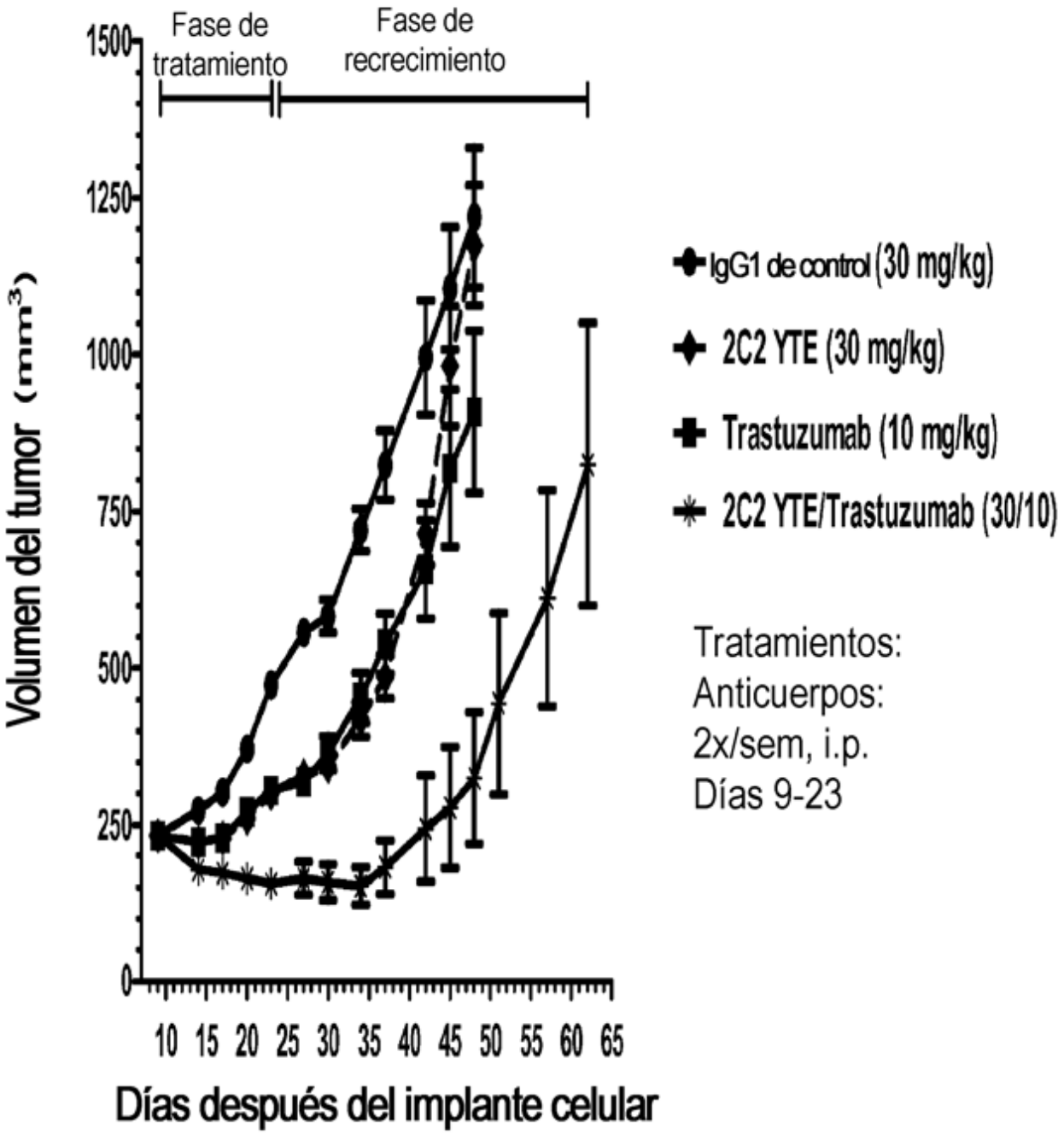

Fase de tratamiento
Fase de recrecimiento
Volumen del tumor (mm³)
1500
1250
1000
750
500
250
0
10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
Días después del implante celular
IgG1 de control (30 mg/kg)
2C2 YTE (30 mg/kg)
Trastuzumab (10 mg/kg)
2C2 YTE/Trastuzumab (30/10)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 9-23

Fig. 34A

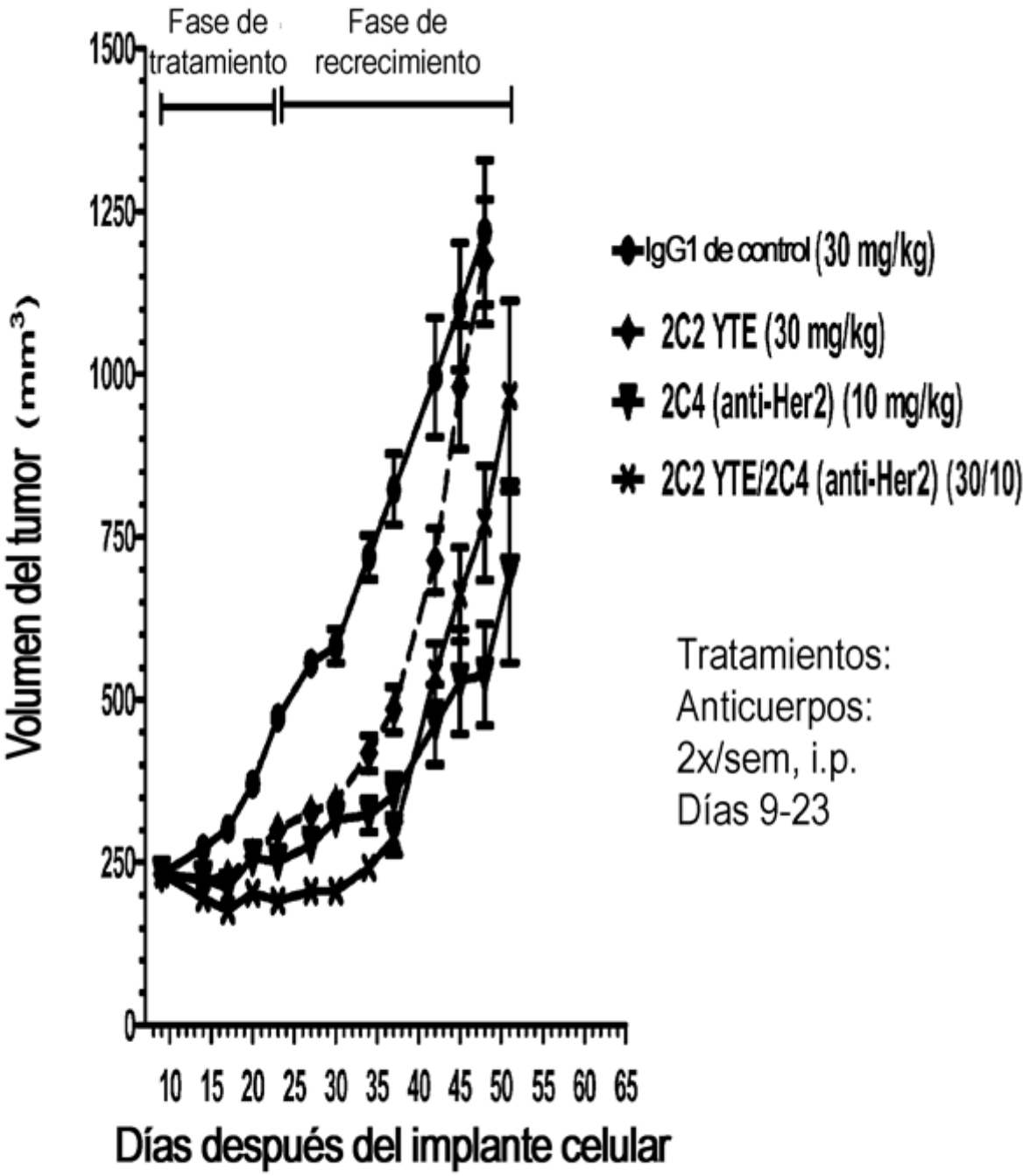

Fase de tratamiento
Fase de recrecimiento
1500
1250
1000
750
500
250
0
Volumen del tumor (mm3)
10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
Días después del implante celular
IgG1 de control (30 mg/kg)
2C2 YTE (30 mg/kg)
2C4 (anti-Her2) (10 mg/kg)
2C2 YTE/2C4 (anti-Her2) (30/10)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 9-23

Fig. 34B

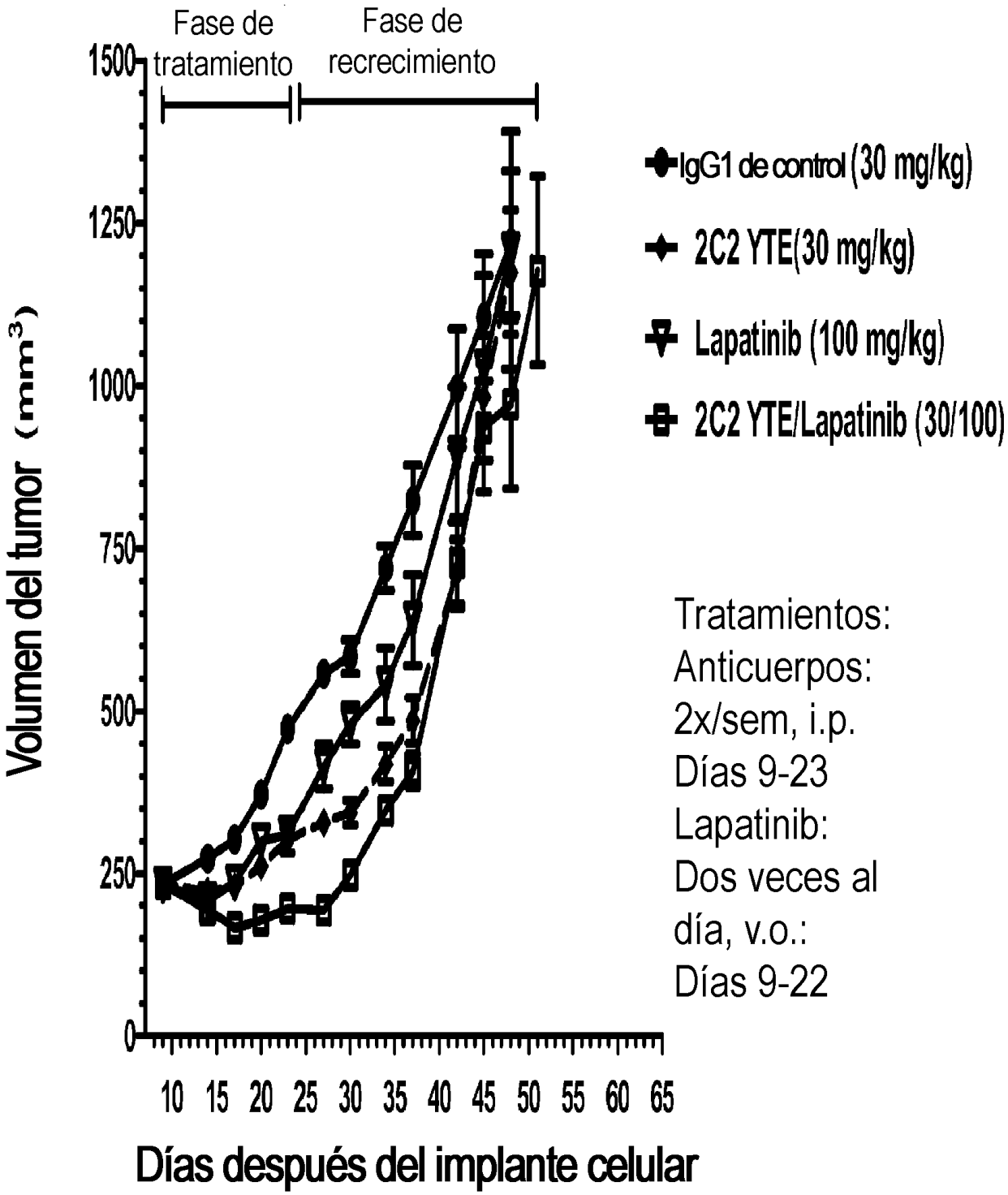

Fase de tratamiento
Fase de recrecimiento
1500
1250
1000
750
500
250
0
Volumen del tumor (mm3)
10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
Días después del implante celular
IgG1 de control (30 mg/kg)
2C2 YTE(30 mg/kg)
Lapatinib (100 mg/kg)
2C2 YTE/Lapatinib (30/100)
Tratamientos:
Anticuerpos:
2x/sem, i.p.
Días 9-23
Lapatinib:
Dos veces al día, v.o.:
Días 9-22

Fig. 34C

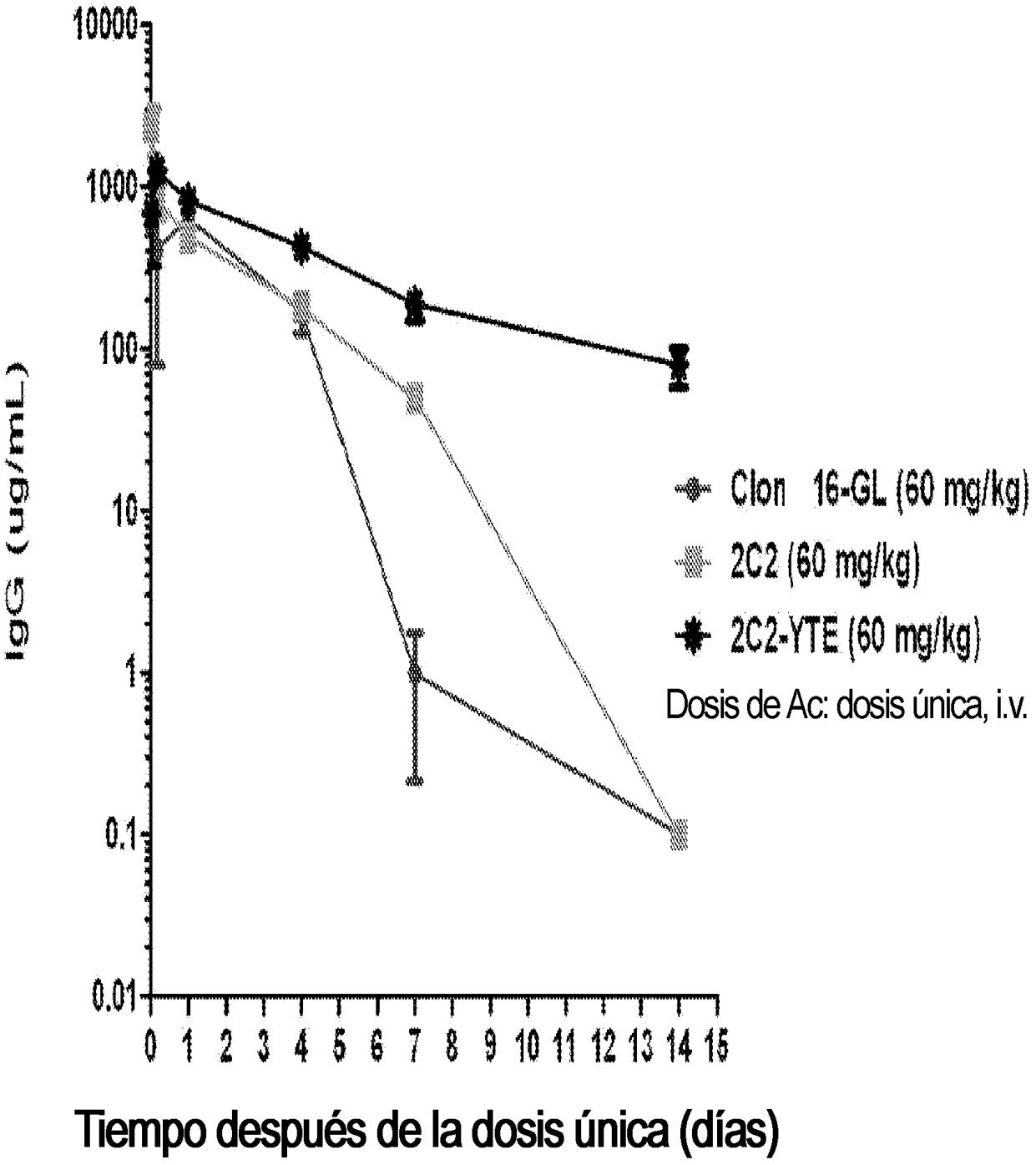

10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
IgG (ug/mL)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Clon 16-GL (60 mg/kg)
2C2 (60 mg/kg)
2C2-YTE (60 mg/kg)
Dosis de Ac: dosis única, i.v.
Tiempo después de la dosis única (días)

Fig. 35

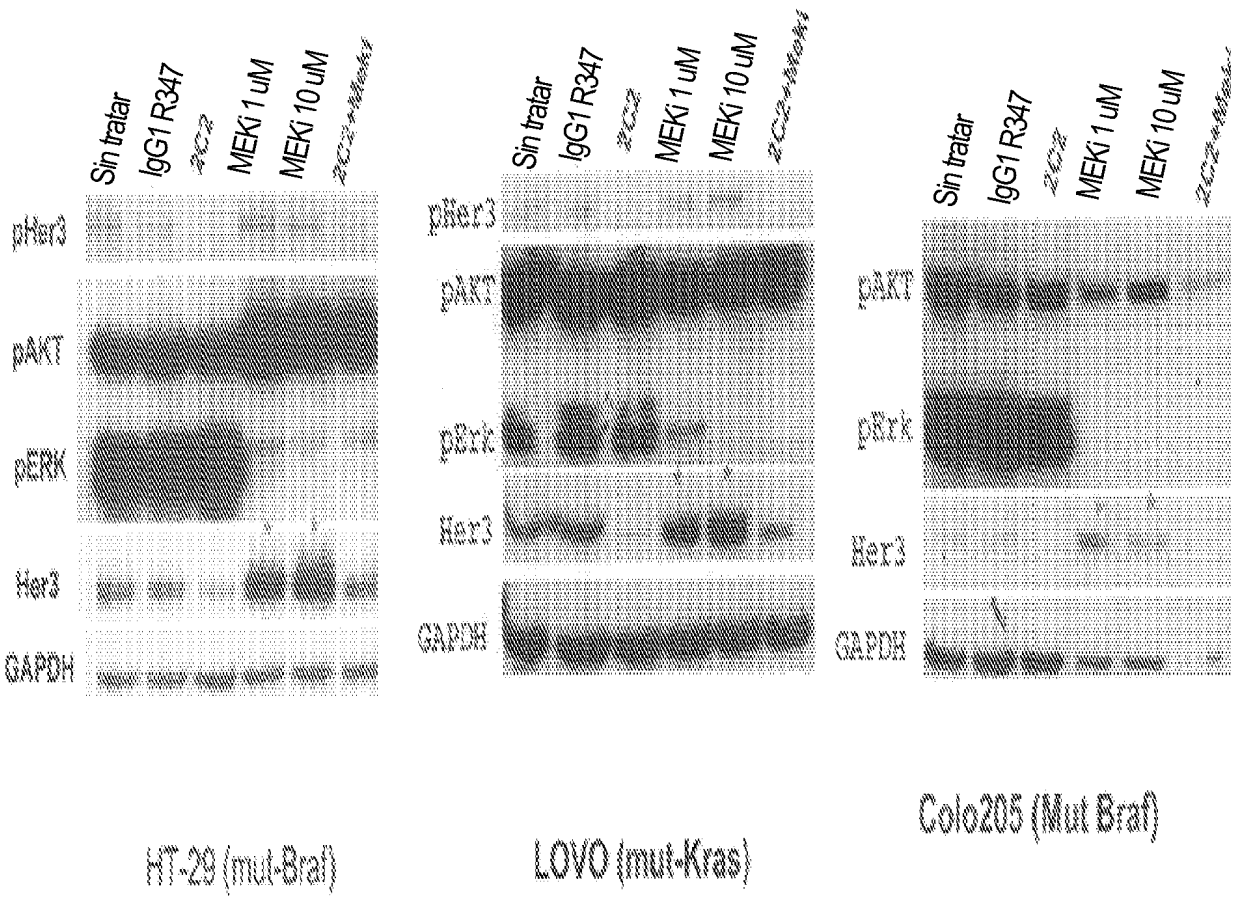

Sin tratar
IgG1 R347
2C2
MEKi 1 uM
MEKi 10 uM
2C2+MEKi
pHer3
pAKT
pERK
Her3
GAPDH
HT-29 (mut-Braf)
pHer3
pAKT
pErk
Her3
GAPDH
LOVO (mut-Kras)
pAKT
pErk
Her3
GAPDH
Colo205 (Mut Braf)

Fig. 36

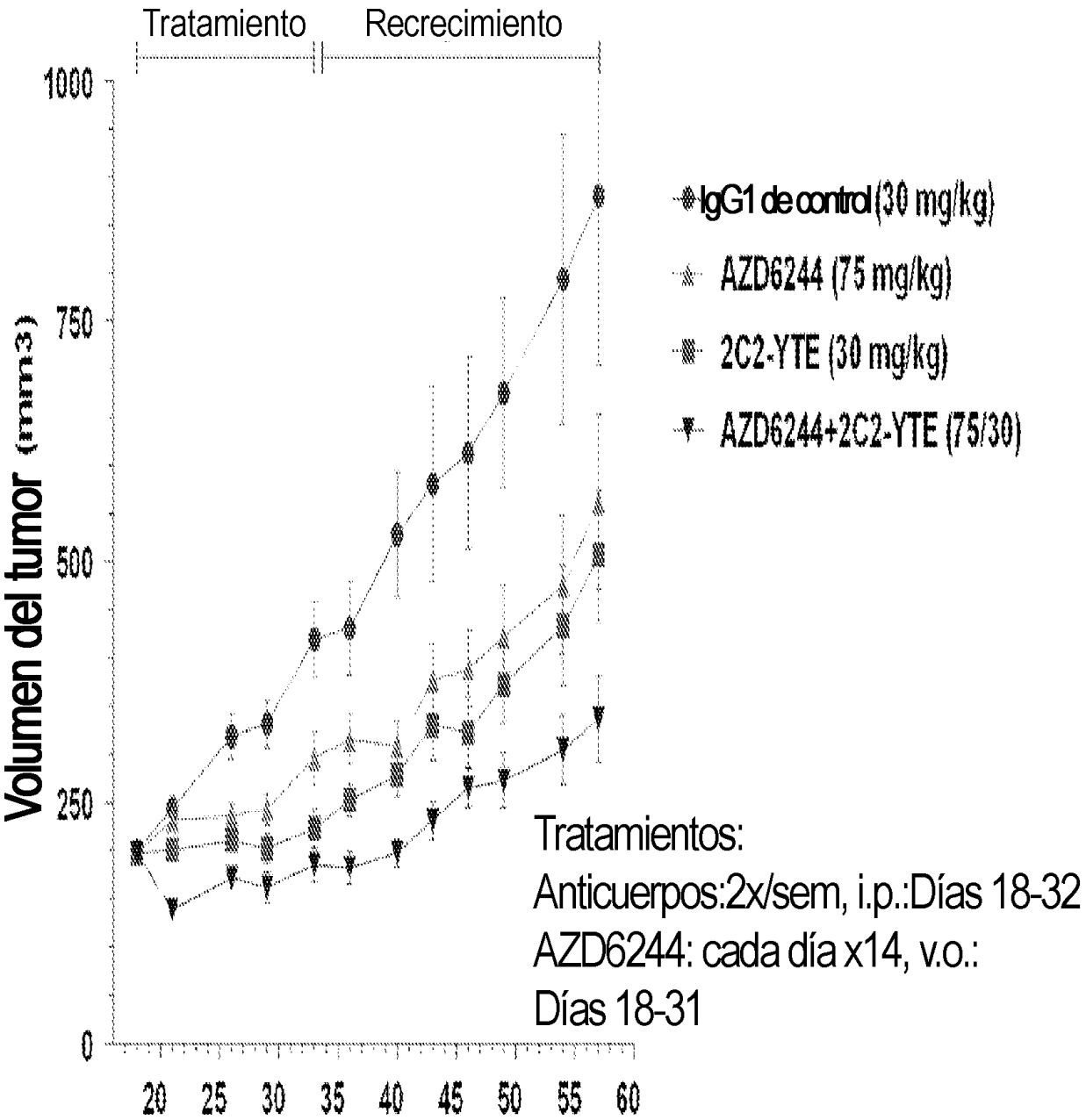


Fig. 37A parte I

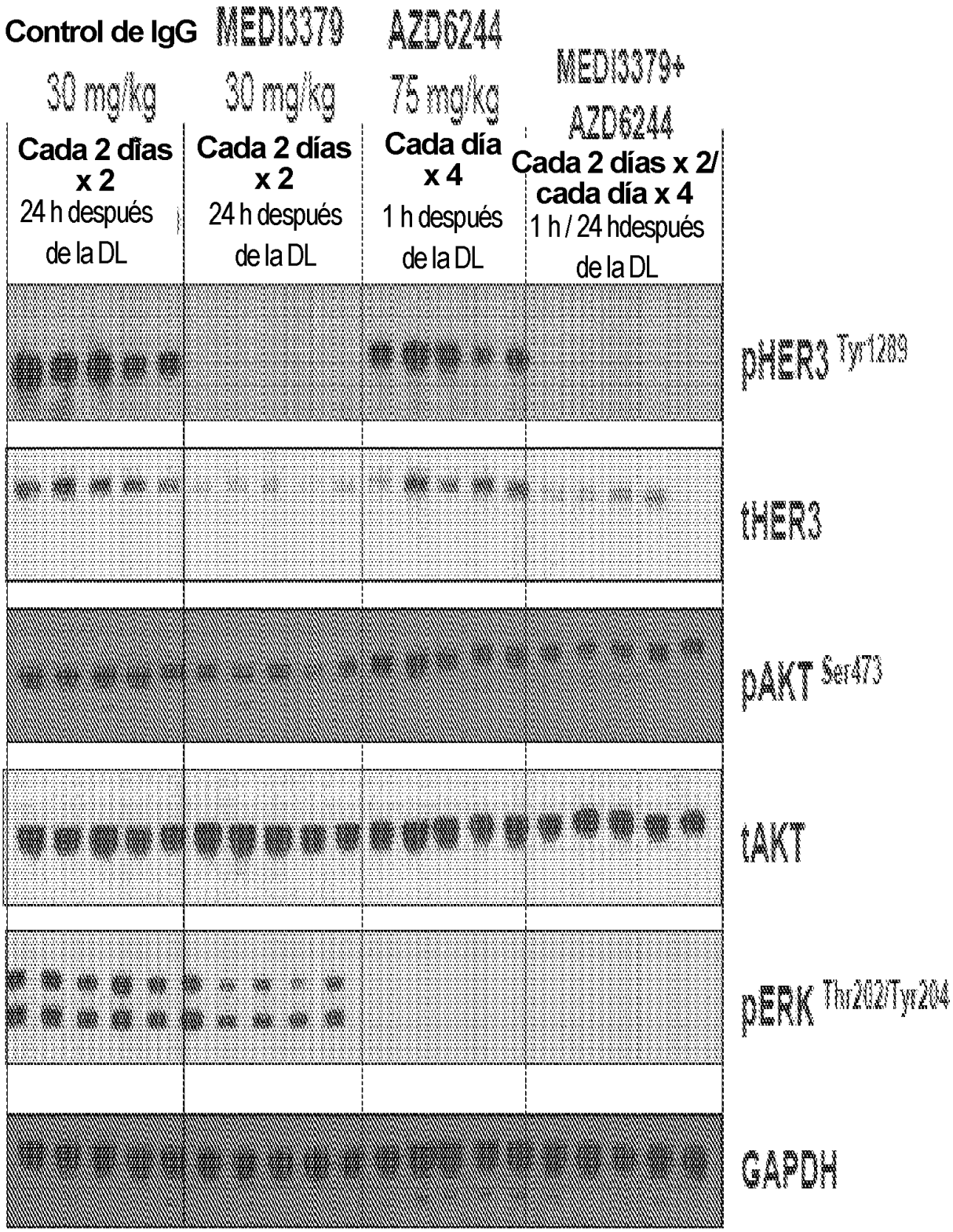


Fig. 37A parte II

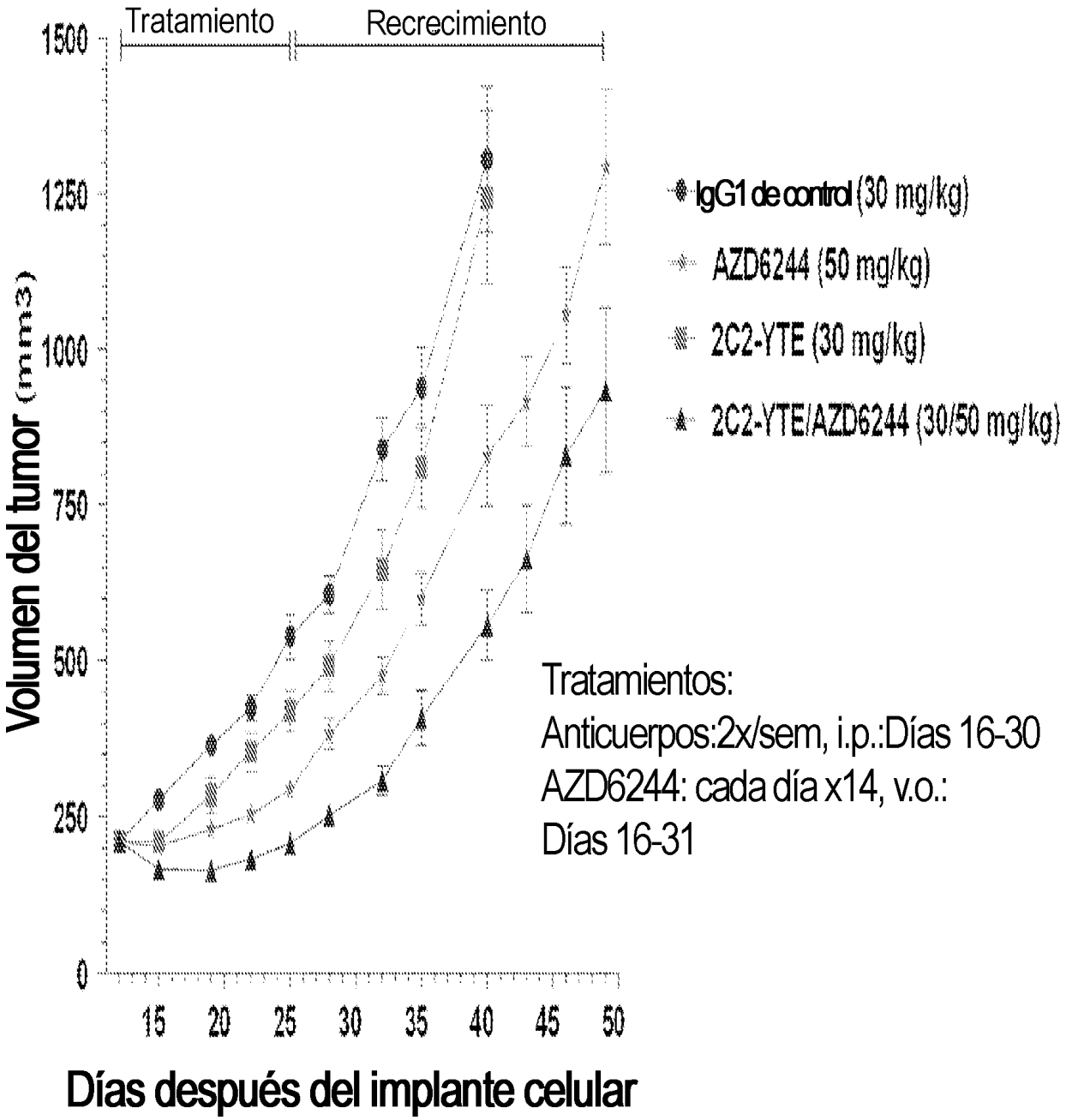


Fig. 37B parte I

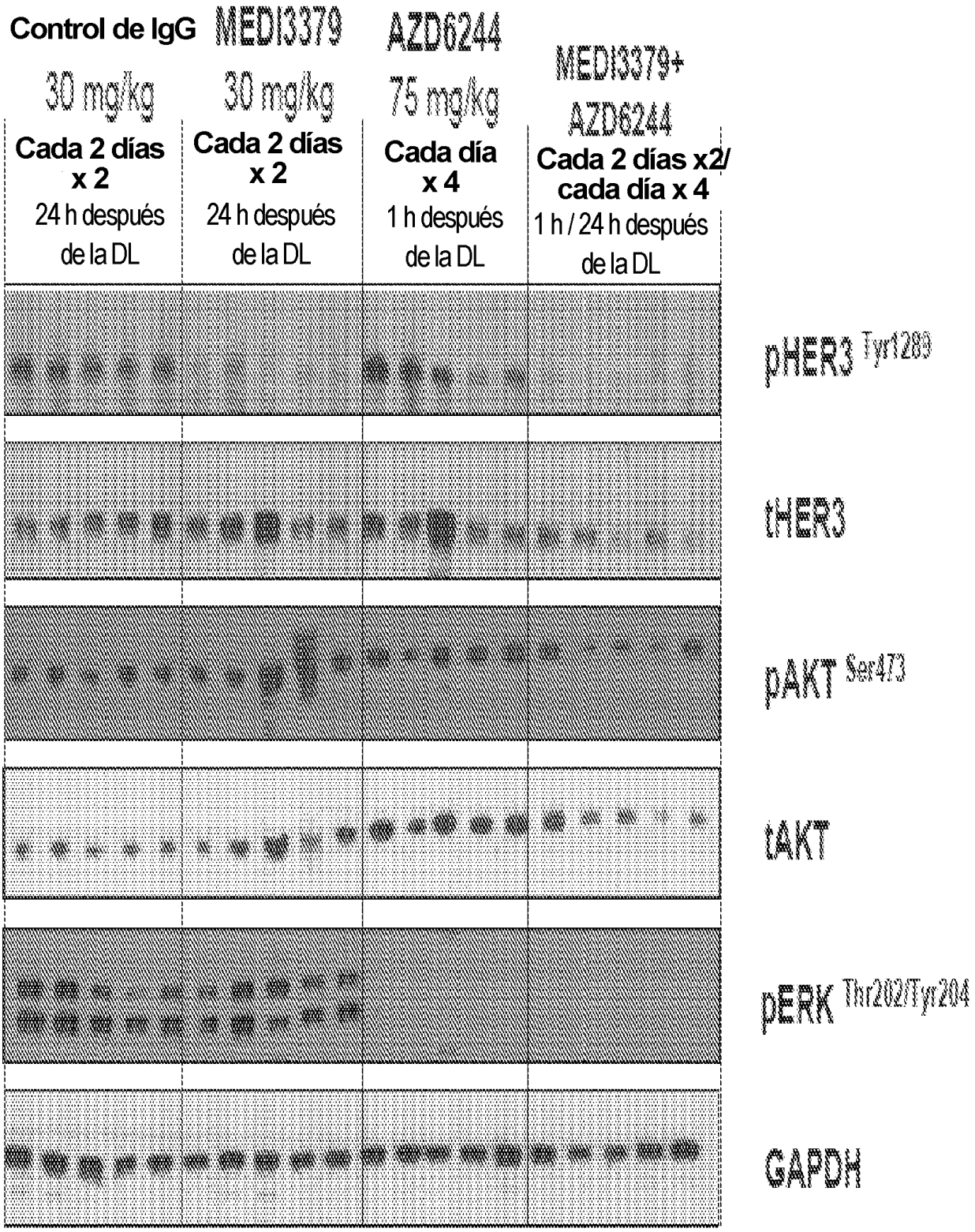


Fig. 37B parte II

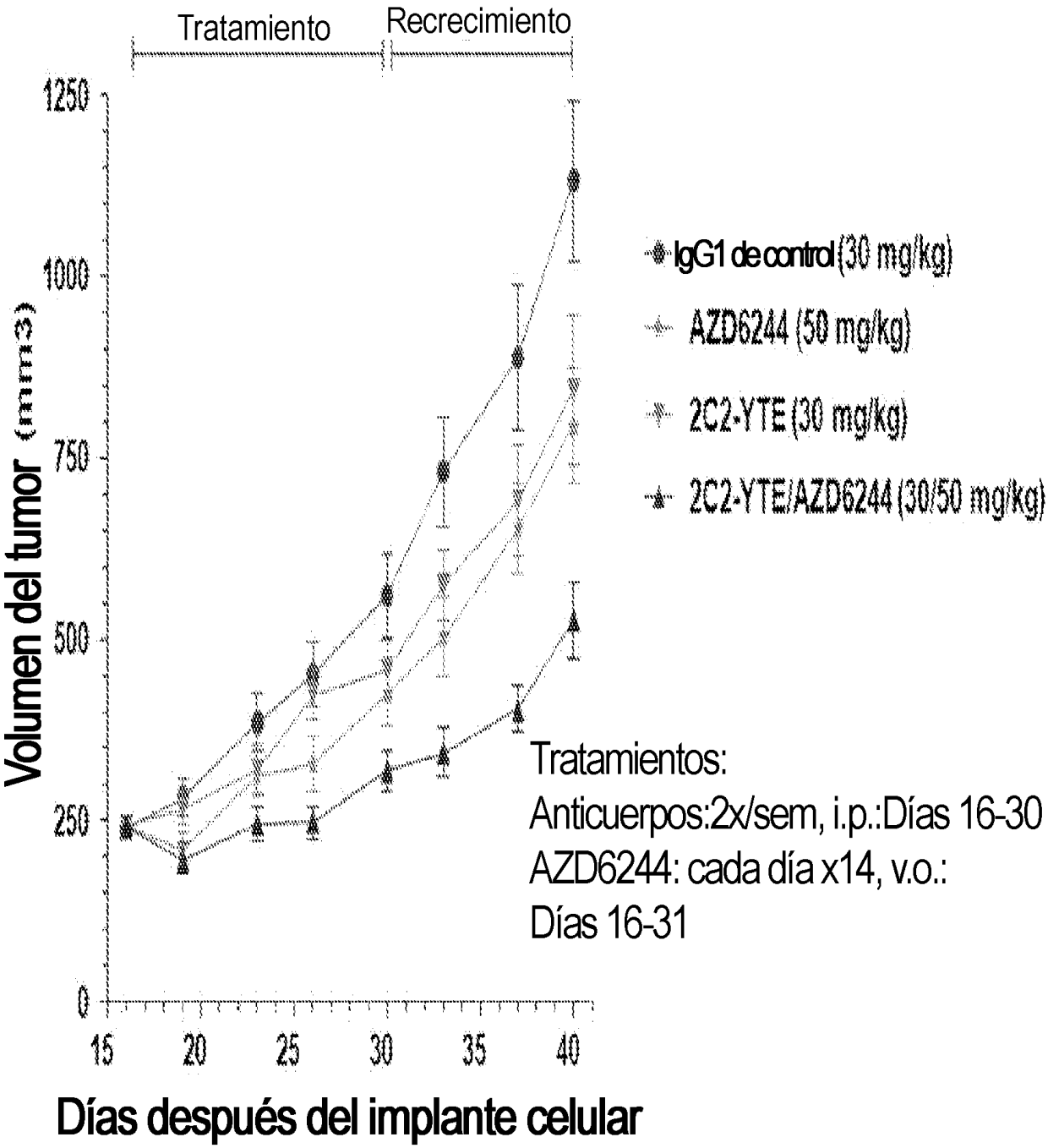


Fig. 37C parte I

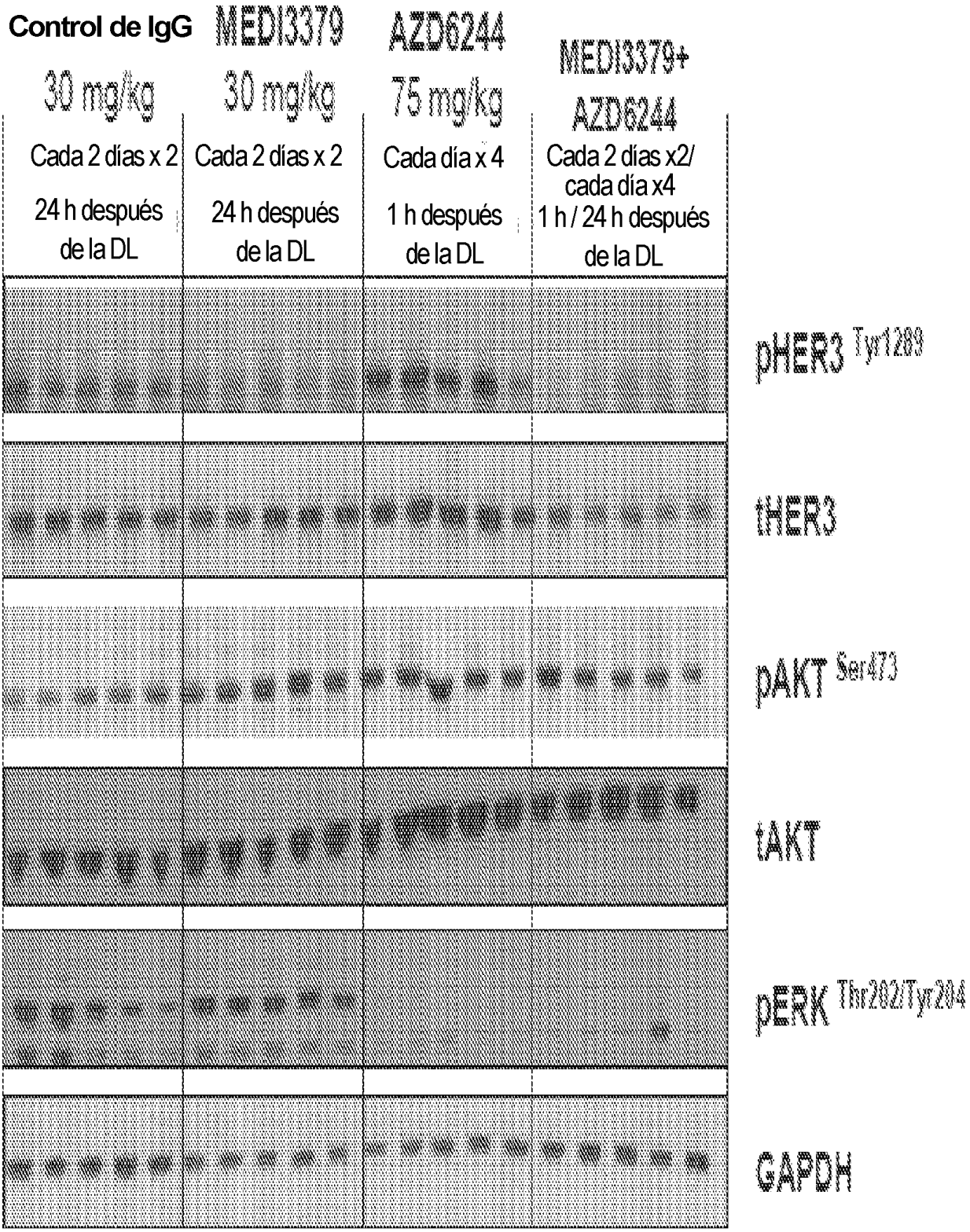


Fig. 37C parte II