

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 862**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2012** **PCT/EP2012/058769**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012** **WO12156309**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2012** **E 12719763 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017** **EP 2707391**

54 Título: **Anticuerpos contra HER3**

30 Prioridad:

13.05.2011 EP 11305583

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2018

73 Titular/es:

GAMAMABS PHARMA (50.0%)
Centre Pierre Potier, 1 place Pierre Potier,
Oncopole Entrée B, BP50624
31106 Toulouse, Cedex 1, FR y
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)

72 Inventor/es:

KHARRAT, ABDELHAKIM;
DUBREUIL, OLIVIER;
LAZREK, YASSAMINE;
MONDON, PHILIPPE;
BOUAYADI, KHALIL;
CHARDES, THIERRY;
PELEGRIN, ANDRÉ;
LARBOURET, CHRISTEL y
GABORIT, NADÈGE, A.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 657 862 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra HER3.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a HER-3 (ErbB3).

5 Antecedentes de la invención

La familia de receptores de tirosina cinasas del factor de crecimiento epidérmico humano (EGF) incluye cuatro miembros: EGFR (ErbB1, HER1), HER2 (c-Neu, ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4) (Hynes et. al. (1994)).

10 Se prevé que estos receptores HER consistan en un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio de extensión de membrana, un dominio de proteína tirosina cinasa (PTK, por sus siglas en inglés) citosólica y un dominio de fosforilación en el extremo C (véase, por ejemplo, Kim et al., (1998)). La activación del receptor a través de la unión al ligando conduce a una señalización posterior que influye sobre la proliferación celular, la invasión y supervivencia de células normales y células cancerosas.

15 La expresión o actividad aberrante de EGFR y HER2 se ha correlacionado con muchos cánceres que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón, mama, ovario, colon y vejiga y diversas terapias de direccionamiento han exhibido eficacia clínica (véase la revisión de Hynes and Lane, Nature Rev., 2005).

Existen dos clases principales de productos terapéuticos anti-HER: anticuerpos de unión al ectodominio (cetuximab, panitumumab y trastuzumab) e inhibidores del dominio de tirosina cinasa (erlotinib, gefitinib y lapatinib). La mayoría de estas terapias clínicas se dirigen a los receptores EGFR y HER2.

20 Sin embargo, a pesar del éxito clínico, estas terapias de direccionamiento para EGFR y HER2 están limitadas debido a problemas de resistencia adquirida. De hecho, los pacientes que reciben estos agentes exhiben resistencia primaria o intrínseca a estos inhibidores y aquellos que no responden eventualmente manifiestan resistencia secundaria o adquirida (Kruser and Wheeler, Exp Cell Res, 2010). Además, estas terapias se prescriben solo en determinados estadios de la enfermedad neoplásica. Solo el 20-30 % de los pacientes con cáncer de mama que sobreexpresa el receptor HER2 o que demuestra amplificación génica de HER2 en tumores, reúne las condiciones para recibir el tratamiento con Trastuzumab, lo cual reduce sus indicaciones terapéuticas.

Se ha descrito un receptor HER adicional, HER3, (Plowman (1990)), y se ha evaluado su función en el cáncer (Horst et al. (2005); Xue et al. (2006)).

30 La unión del ligando Heregulina (HRG) con el receptor HER3 desencadena la heterodimerización de HER3 con los otros receptores de la familia HER. Dentro del heterodímero, el dominio cinasa de HER3 actúa como un activador alostérico de su socio de la familia HER (Campiglio M, et al. (1999); Karamouzis MV et al. (2007)).

El heterodímero HER2/HER3 tiene la actividad mitógena más intensa en la familia HER y es la principal señal oncogénica que conduce a la proliferación e invasión de células tumorales en los cánceres de mama (Citri et al. (2006); Lee-Hoeflich et al. (2008)).

35 Además de su sobreexpresión en numerosos cánceres humanos, tales como cánceres de mama, gastrointestinal, de ovario y pancreático, se ha hallado que la expresión o señalización de HER3 está asociado con la resistencia a terapias basadas en anticuerpos contra EGFR y HER2 (véase la revisión de Campbell et al., (2010)). Además, se ha demostrado que los tumores con expresión baja de HER2, que no reúnen las condiciones para el tratamiento con trastuzumab, a menudo demuestran una expresión alta del receptor HER3, asociado con un mal pronóstico (Travis et al. (1996); Naidu et al. (1998), Menendez et al. (2006)). En ambos casos, esta programación de HER3 promueve la formación de heterodímeros HER2/HER3.

El gran potencial de HER3 y la necesidad de alternativas a la terapia de inhibición de EGFR o HER2 para enfrentar los mecanismos de resistencia, sugiere que los agentes dirigidos a HER3 y, en particular anticuerpos, podrían utilizarse como inmunoterapéuticos eficaces.

45 Se han descrito anticuerpos anti-HER3 murinos y quiméricos: US5968511, US5480968, WO03013602. También se han descrito anticuerpos anti-HER3 humanos: US2008/0124345, US2009/0291085A1.

Sin embargo, la participación creciente de HER3 en muchos tipos de cáncer y la complejidad de la cooperación e interdependencia entre la familia HER y, en particular la relacionada con el receptor HER3, conduce a la necesidad de más fármacos dirigidos a este receptor, así como al complejo HER2-HER3.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-HER3 que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende el SEQ ID NO: 1 para H-CDR1, el SEQ ID NO: 2 para H-CDR2 y el SEQ ID NO: 3 para H-CDR3; y una cadena ligera en la que el dominio variable comprende el SEQ ID NO: 4 para L-CDR1, el SEQ ID NO: 5 para L-CDR2 y el SEQ ID NO: 6 para L-CDR3.

- 5 Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también se refiere a un anticuerpo de la invención para uso como fármaco y, en particular, para uso en el tratamiento del cáncer.

Descripción detallada de la invención

10 Definiciones

El término «anticuerpo anti-HER3» hace referencia a un anticuerpo dirigido contra HER3, en particular, HER3 humano. El anticuerpo anti-HER3 podría dirigirse contra un monómero de HER3 o HER3 en un heterodímero que comprende HER3 seleccionado del grupo que consiste en HER2-HER3, también denominado en la presente complejo HER2-HER3, EGFR-HER3 y HER4-HER3.

- 15 La secuencia de HER3 se describe en Uniprot con el número de referencia P21860. De aquí en adelante, los aminoácidos de HER3 se enumeran en referencia a Uniprot.

En una realización específica, el término «anticuerpo anti-HER3» hace referencia a un anticuerpo que se une al dominio extracelular del polipéptido de HER3 humano según se define en el SEQ ID NO: 32 (Tabla A).

Tabla A: Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de HER3 20-643 secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de HER3 humano 20-643 ; P21860 Uniprot)	SEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDENQYQTLKLYERCEVVMGNLEIVLTG HNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGGKFAIFVM LNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDA EIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGEEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGP NPNQCCHDECAGGCSGPQDTCFACRHFNDGACVPRCPQPLVYNKLT QLEPNPHTKYQYGGVCAVSCPHNFVVDQTSVRCPPDKMEVDKNGLKM CEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNG DPWHKIPALDPEKLNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVFSNLTTIGGRS LYNRGFSLLIMKLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSNWTKVLR GPTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKVCDPLCSSGGCWGPGPGQCLSCRNYS RGGVCVTHCNFLNGEPREFAEAEFCFSCHPECQPMEGTATCNGSGSDTC AQCAHFRDGPCHVSSCPHGVLGAKGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQGCK GPELQDCLGQTLVLIGKTHLT (SEQ ID NO: 32)
--	---

- 20 Según la presente invención, «anticuerpo» o «inmunoglobulina» tienen el mismo significado, y se utilizarán de igual forma en la presente invención. El término «anticuerpo», según se usa en la presente memoria, hace referencia a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une de forma inmuno-específica a un antígeno.
- 25 Así, el término anticuerpo abarca no solo las moléculas de anticuerpo enteras, sino también fragmentos de anticuerpo, incluidos fragmentos de unión a antígeno, así como variantes (incluidos derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. En anticuerpos convencionales, dos cadenas pesadas se enlazan entre sí mediante enlaces disulfuro y cada cadena pesada se enlaza a una cadena ligera mediante un enlace disulfuro. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda (l) y kappa (k). Existen cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencia distintos. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, denominados de forma colectiva CH). Las regiones variables de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad de unión para el antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren importantes propiedades biológicas tales como asociación de
- 30 cadena de anticuerpo, secreción, movilidad transplacentaria, unión a complemento y unión a receptores Fc (FcR). El
- 35

fragmento Fv es la parte terminal del extremo N del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación del anticuerpo están compuestos por residuos que son principalmente de las regiones hipervariables o de determinación de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los residuos de regiones no hipervariables o de marco (FR) influyen sobre la estructura de dominio genera y, por lo tanto, sobre el sitio de combinación. Las regiones de determinación de complementariedad o CDR hacen referencia a secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad y especificidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina natural. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Por lo tanto, el sitio de unión a antígeno incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de una región V de cadena pesada y ligera. Las regiones de marco (FR) hacen referencia a secuencia de aminoácidos interpuestas entre las CDR.

Según se usan en la presente memoria, los residuos de anticuerpos se enumeran según el esquema de Kabat.

El término «anticuerpo humano» hace referencia a un anticuerpo en el que una porción sustancial de la molécula de anticuerpo se parece, en secuencia de aminoácidos o estructura, a la de un anticuerpo derivado de origen humano. Típicamente, H3A-32, H3A-76, H3A-81, H4B-05 y H4B-121 son anticuerpos humanos.

Un «anticuerpo humano» puede considerarse más adecuado en casos en que es deseable reducir la inmunogenicidad del anticuerpo para administración a humanos con fines terapéuticos.

El término «Fab» denota un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de alrededor de 50 000 y actividad de unión a antígeno, en el que alrededor de una mitad del lado del extremo N de la cadena H y toda la cadena L, entre fragmentos obtenidos al tratar la IgG con una proteasa, papaína, se unen entre sí mediante un enlace disulfuro.

El término «F(ab')₂» hace referencia a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de alrededor de 100 000 y actividad de unión a antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido a través de un enlace disulfuro a la región bisagra, entre fragmentos obtenidos al tratar la IgG con una proteasa, papaína.

El término «Fab'» hace referencia a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de alrededor de 50 000 y actividad de unión a antígeno, que se obtiene al cortar un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')₂.

Un polipéptido Fv de cadena simple («scFv») es un heterodímero VH::VL enlazado covalentemente que generalmente se expresa a partir de una fusión génica que incluye los genes que codifican para VH y VL enlazados mediante un enlazador que codifica para un péptido. «dsFv» es un heterodímero VH::VL estabilizado mediante un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpo divalentes y multivalentes se pueden formar de manera espontánea mediante la asociación de scFv monovalentes, o se pueden generar al acoplar scFv monovalentes mediante un enlazador peptídico, tal como sc(Fv)₂ divalente.

El término «diacuerpos» hace referencia a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es muy corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

Se entiende por «purificado/a» y «aislado/a», en referencia a un polipéptido (es decir, un anticuerpo según la invención) o a una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en la ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término «purificado/a», según se usa en la presente memoria, preferiblemente significa al menos 75 % en peso, más preferiblemente al menos 85 % en peso, aún más preferiblemente al menos 95 % en peso y lo más preferible al menos 98 % en peso de macromoléculas biológicas del mismo tipo presentes. Una molécula de ácido nucleico «aislada» que codifica para un polipéptido específico hace referencia a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican para el polipéptido; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan de forma nociva las características básicas de la composición.

Se entiende por «cantidad terapéuticamente eficaz» una cantidad mínima de agente activo (p. ej., anticuerpos anti-HER3) que es necesaria para impartir un beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una «cantidad terapéuticamente eficaz» para un mamífero es una cantidad que induce, mejora o causa de otra forma una mejora en los síntomas patológicos, la progresión de la enfermedad o las condiciones fisiológicas asociadas con o la resistencia a padecer un trastorno.

Según se utiliza en la presente, el término «sujeto» denota un mamífero, como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un sujeto, según la invención, es un humano.

«Tratamiento o tratar» hacen referencia tanto al tratamiento terapéutico como a medidas preventivas y profilácticas, en donde el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) el trastorno o afección patológica diana. Los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno, así como aquellos propensos a padecer el trastorno o aquellos en los cuales se desea evitar el trastorno. Por lo tanto, el sujeto que se tratará en la presente puede haber sido diagnosticado con un trastorno o puede estar predispuesto o ser propenso al trastorno.

Los términos «cáncer» y «canceroso» hacen referencia a o describen la afección fisiológica en sujetos que se caracteriza típicamente por un crecimiento o muerte celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más específicos de dichos cánceres incluyen cáncer de célula escamosa (por ejemplo, cáncer de célula escamosa epitelial), cáncer de pulmón que incluye cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer renal o de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como también cáncer de las vías aéreas superiores.

Anticuerpos y polipéptidos de la invención

Los inventores clonaron y caracterizaron los dominios variables de las cadenas ligera y pesada de muchos anticuerpos monoclonales anti-HER3 humanos (mAb, por sus siglas en inglés). Entre estos mAb, los inventores identificaron que los mAb con regiones de determinación de complementariedad (CDR), según se describen en la Tabla 1, eran inhibidores de la actividad biológica de HER3.

Los inventores demostraron, en particular, que estos anticuerpos anti-HER3 eran potentes inhibidores de la formación de un heterodímero que comprendía HER3 seleccionado del grupo que consiste en complejo HER2-HER3, EGFR-HER3 y HER4-HER3, y, más particularmente, de la formación del complejo HER2-HER3.

Los inventores demostraron, especialmente, que los anticuerpos de la invención exhiben una unión mayor a HER3 cuando HER3 está en el heterodímero HER2-HER3 en comparación con anticuerpos anti-HER3 conocidos, por ejemplo, aquellos descritos en la patente US2008/0124345A1 y US2009/0291085A1.

Además, los inventores también demostraron que los anticuerpos en la invención inhiben la unión de heregulina a HER3.

Tabla 1: Dominios H-CDR de anticuerpos anti-HER3 según la invención:

H-CDR1	DYAMH (SEQ ID NO : 1)
H-CDR2	ISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO : 2)
H-CDR3	EGQWPNYGMDV (SEQ ID NO : 3)

La invención se refiere a un anticuerpo anti-HER3 que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende el SEQ ID NO: 1 para H-CDR1, el SEQ ID NO: 2 para H-CDR2 y el SEQ ID NO: 3 para H-CDR3; y una cadena ligera en la que el dominio variable comprende el SEQ ID NO: 4 para L-CDR1, el SEQ ID NO: 5 para L-CDR2 y el SEQ ID NO: 6 para L-CDR3.

Entre los anticuerpos en el presente texto, cinco anticuerpos han exhibido resultados particularmente buenos. Se denominan mAb H3A-32, mAb H3A-76, mAb H3A-81, mAb H4B-05 y mAb H4B-121. Los dominios VH, VL y CDR de estos anticuerpos se describen respectivamente en la Tabla 2 a 6.

Tabla 2: Dominios VH, VL y CDR de mAb H3A-32:

Dominios de MAb H3A-32	
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREGQWPNYGMDVWGQGTTVTVS S (SEQ ID NO: 14)
VH CDR1	DYAMH (SEQ ID NO: 1)
VH CDR2	ISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO: 2)
VH CDR3	EGQWPNYGMDV (SEQ ID NO: 3)
VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSDPVNHWYQQLPG TAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEA DYYCAAWDDSLRGYVFGTGTKLTVL (SEQ ID NO: 15)
VL CDR1	SGSSSNIGSDPVN (SEQ ID NO: 11)
VL CDR2	SNNQRPS (SEQ ID NO: 12)
VL CDR3	AAWDDSLRGYV (SEQ ID NO: 13)

Tabla 3: Dominios VH, VL y CDR de mAb H3A-76:

Dominios de MAb H3A-76	
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKDSL QMNSLRAEDTAVYYCAREGQWPNYGMDVWGQGTTVTVS S (SEQ ID NO: 21)
VH CDR1	DYAMH (SEQ ID NO : 1)
VH CDR2	ISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO : 2)
VH CDR3	EGQWPNYGMDV (SEQ ID NO : 3)
VL	

Dominios de MAb H3A-76	
	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNLSNHWYQQLPG TAPKLLIYSNNQRPPGVPDRFSGSRSGSSASLAISGLQSGDEG DYYCAAWDDSLKGYVFGTGTQLTVL (SEQ ID NO: 22)
VL CDR1	SGSSSNIGSNLSN (SEQ ID NO : 18)
VL CDR2	SNNQRPP (SEQ ID NO : 19)
VL CDR3	AAWDDSLKGYV (SEQ ID NO : 20)

Tabla 4: Dominios VH, VL y CDR de mAb H3A-81:

Dominios de MAb H3A-81	
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREGQWPNYGMDVWGQGTTVTVS S (SEQ ID NO: 14)
VH CDR1	DYAMH (SEQ ID NO:1)
VH CDR2	ISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO: 2)
VH CDR3	EGQWPNYGMDV (SEQ ID NO: 3)
VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGGDTVNWYQQLPG TAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEA DYYCAAWDDSLNGYVFGTGTCLTVL (SEQ ID NO: 27)
VL CDR1	SGSSSNIGGDTVN (SEQ ID NO: 25)
VL CDR2	SNNQRPS (SEQ ID NO: 12)
VL CDR3	AAWDDSLNGYV (SEQ ID NO: 26)

Tabla 5: Dominios VH, VL y CDR de mAb H4B-05:

Dominios de MAb H4B-05	
------------------------	--

Dominios de MAb H4B-05	
VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA
	PGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREGQWPNYGMDVWGQGTTVTVS S (SEQ ID NO: 7)
VH CDR1	DYAMH (SEQ ID NO : 1)
VH CDR2	ISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO : 2)
VH CDR3	EGQWPNYGMDV (SEQ ID NO : 3)
VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSRNIGSNTVSWYQQLPG TAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLAISGLQSEDEA DYYCAAWDDSLNGYVFGTGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)
VL CDR1	SGSRNIGSNTVS (SEQ ID NO : 29)
VL CDR2	SNNQRPS (SEQ ID NO : 12)
VL CDR3	AAWDDSLNGYV (SEQ ID NO : 26)

Tabla 6: Dominios VH, VL y CDR de mAb H4B-121:

Dominios de MAb H4B-121	
VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREGQWPNYGMDVWGQGTTVTVS S (SEQ ID NO: 7)
VH CDR1	DYAMH (SEQ ID NO: 1)
VH CDR2	ISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO: 2)
VH CDR3	EGQWPNYGMDV (SEQ ID NO: 3)
VL	

Dominios de MAb H4B-121	
	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCPGSSSNIGNNYVSWYQQLPG TAPKLLIYDNNERPSGIPDRFSGTSGTSATLDTDLQAEDEA TYYCGAWDNTLGVYVLGTGTQLTVL (SEQ ID NO: 8)
VL CDR1	PGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO: 4)
VL CDR2	DNNERPS (SEQ ID NO: 5)
VL CDR3	GAWDNTLGVYV (SEQ ID NO: 6)

Por lo tanto, se describe en particular el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 7, el SEQ ID NO: 14 y el SEQ ID NO: 21.

5 Según una realización específica de la invención, el dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7.

También se describe el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo que comprende una cadena ligera cuyo dominio variable comprende:

- L-CDR1 seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 4, el SEQ ID NO: 11, el SEQ ID NO: 18, el SEQ ID NO: 25 y el SEQ ID NO: 29,
- 10 - L-CDR2 seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 5, el SEQ ID NO: 12 y el SEQ ID NO: 19 y
- L-CDR3 seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 6, el SEQ ID NO: 13, el SEQ ID NO: 20 y el SEQ ID NO: 26.

Se describe el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 8, el SEQ ID NO: 15, el SEQ ID NO: 22, el SEQ ID NO: 27 y el SEQ ID NO: 30.

15 En una realización de la invención, el dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 8.

El presente texto también describe el anticuerpo anti-HER3 seleccionado del grupo que consiste en:

- un anticuerpo que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en el SEQ ID NO: 7, y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 8 y el SEQ ID NO: 30,
- 20 - un anticuerpo que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en el SEQ ID NO: 14, y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 15 y el SEQ ID NO: 27 y
- 25 - un anticuerpo que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en el SEQ ID NO: 21, y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 22.

En una realización específica, el anticuerpo anti-HER3 según la invención es un anticuerpo humano.

Dichos anticuerpos se pueden producir usando cualquier técnica conocida en la técnica. En particular, dichos anticuerpos se producen mediante técnicas tales como las descritas más adelante en la presente memoria.

30 La invención proporciona, además, fragmentos de dichos anticuerpos que incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Los anticuerpos y polipéptidos de la invención se pueden utilizar en forma aislada (p. ej., purificados) o contenidos en un vector, tal como una membrana o vesícula lipídica (p. ej., un liposoma).

Ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras recombinantes

Se describe, además, un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para al menos la cadena pesada del anticuerpo según la invención o un fragmento de unión a antígeno de este.

- 5 El presente texto describe una secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio VH o el dominio VL del mAb H3A-32, mAb H3A-76, mAb H3A-81, mAb H4B-05 y mAb H4B-121, según se describen en la Tabla 7.

Tabla 7: Ácidos nucleicos de los dominios VH y VL de mAb de la invención

mAb H3A-32	Dominio VH:	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGT TCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTG GGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGG TCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGGCT ATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCA GAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGAGAAGGGCAGTGGCCGAAGTACGGTA TGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA (SEQ ID NO: 16)
	Dominio VL:	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGG ACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGA AGCAGCTCCAACATCGGAAGTGATCCTGTAAACTG GTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAAGTCC TCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCC CTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAG CCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCCGAGGATG AGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGC CTGAGGGGTTATGTCTTCGGAAGTGGGACCAAGCT GACCGTCCTA (SEQ ID NO: 17)
mAb H3A-76	Dominio VH:	

		GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTG GGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGG TCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGGCT ATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCA GAGACAACGCCAAGGACTCACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGAGAAGGGCAGTGGCCGAACACTACGGTA TGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA (SEQ ID NO: 23)
	Dominio VL:	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCACCCTCAGCGTCTGGG ACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGA AGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTCTTTAAACTGG TACCAGCAGCTCCCGGGAACGGCCCCCAAACCTCT CATCTACAGTAATAATCAGCGGCCCCCAGGGGTCC CTGACCGATTCTCTGGCTCCAGGTCTGGCTCCTCGG CCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGGGGATG AGGGTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGC CTGAAGGGTTATGTCTTCGGAACCTGGGACCCAGCTC ACCGTTTTA (SEQ ID NO: 24)
mAb H3A-81	Dominio VH:	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGT TCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTG GGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGG TCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGGCT ATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCA GAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGAGAAGGGCAGTGGCCGAACACTACGGTA TGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA (SEQ ID NO: 16)

	Dominio VL:	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGG ACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGA AGCAGCTCCAACATCGGAGGTGATACTGTAAACTG GTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCC TCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCC CTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAG CCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCTGAGGATG AGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGC CTGAATGGTTATGTCTTCGGCACTGGGACCAAGCTG ACCGTCCTA (SEQ ID NO: 28)
mAb H4B-05	Dominio VH:	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTG GGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGG TCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGGCT ATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCA GAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGAGAAGGGCAGTGGCCGAACCTACGGTA TGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA (SEQ ID NO: 9)
	Dominio VL:	

		CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGG ACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGA AGCAGGTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAGCTG GTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCC TCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCC CTGACCGATTCTCTGGCTCCCAGTCTGGCACCTCAG CCTCCCTGGCCATCAGTGGACTCCAGTCTGAGGATG AGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGC CTGAATGGTTATGTCTTCGGAACCTGGGACCAAGCTG ACCGTCCTA (SEQ ID NO: 31)
mAb H4B-121	Dominio VH:	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTG GGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGG TCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGGCT ATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCA GAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGAGAAGGGCAGTGGCCGAACCTACGGTA TGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA (SEQ ID NO: 9)
	Dominio VL:	

		CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCG GCCCCAGGGCAGAAGGTCACCATCTCCTGCCCTGG AAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTG GTACCAGCAGCTCCCAGGGACAGCCCCCAAACCTCC TCATTTATGACAATAATGAGCGACCCCTCAGGGATTCTG GACCGATTCTCTGGCTCCACGTCTGGCACGTCAG CCACCCTGGACATCACCGACCTCCAGGCTGAGGAC GAGGCCACTTATTATTGCGGTGCCTGGGATAACACC CTGGGTGTTTACGTCCTCGGAACTGGGACCCAGCTC ACCGTTTTA (SEQ ID NO: 10)
--	--	--

Tabla 8: Resumen de los núms. de SEQ ID NO. de los mAb

	mAb	mAb	mAb	mAb	mAb
	H3A-32	H3A-76	H3A-81	H4B-05	H4B-121
Dominio VH	14	21	14	7	7
Ácido nucleico del dominio VH	16	23	16	9	9
Dominio VL	15	22	27	30	8
Ácido nucleico del dominio VL	17	24	28	31	10
H-CDR1	1	1	1	1	1
H-CDR2	2	2	2	2	2
H-CDR3	3	3	3	3	3
L-CDR1	11	18	25	29	4
L-CDR2	12	19	12	12	5
L-CDR3	13	20	26	26	6

- 5 Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que se puede incluir en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral.

Los términos «vector», «vector de clonación» y «vector de expresión» significan el vehículo por medio del cual una secuencia de ADN o ARN (p. ej., un gen foráneo) se puede introducir en una célula hospedadora, con el fin de transformar el hospedador y promover la expresión (p. ej., transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

- 10 Por lo tanto, el presente texto describe un vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para provocar o dirigir la expresión de dicho anticuerpo tras la administración a un sujeto. Los ejemplos de

promotores y potenciadores utilizados en el vector de expresión para la célula animal incluyen el promotor temprano y promotor de SV40 (Mizukami T. et al. 1987), el promotor y potenciador LTR del virus de la leucemia de ratón Moloney (Kuwana Y et al. 1987), promotor (Mason JO et al. 1985) y potenciador (Gillies SD et al. 1983) de la cadena H de inmunoglobulina y similares.

- 5 Se puede utilizar cualquier vector de expresión para una célula animal, siempre que se pueda insertar y expresar un gen que codifica para la región C del anticuerpo humano. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984), pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H et al. 1990) y similares.

- 10 Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integradores, tales como por ejemplo pUC, pcDNA, pBR y similares.

- 15 Otros ejemplos de vector viral incluyen vectores adenovirales, retrovirales, del virus del herpes y del AAV. Dichos virus recombinantes se pueden producir mediante técnicas conocidas en la técnica, tal como células de envoltorio transfectantes o mediante transfección transitoria con plásmidos auxiliares o virus. Los ejemplos típicos de células de envoltorio de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Se pueden encontrar protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes con defecto de replicación, por ejemplo, en WO 95/14785, WO 96/22378, US 5 882 877, US 6 013 516, US 4 861 719, US 5 278 056 y WO 94/19478.

El presente texto describe, además, una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o un vector según la invención.

- 20 Típicamente, la célula hospedadora se ha transfectado, infectado o transformado mediante un ácido nucleico o un vector descrito anteriormente.

- 25 El término «transformación» significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o ARN «foráneo» (es decir, extrínseco o extracelular) en una célula hospedadora, de manera que la célula hospedadora expresará el gen o secuencia introducido para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducido. Una célula hospedadora que recibe y expresa el ADN o ARN introducido se ha «transformado».

Los ácidos nucleicos descritos se pueden utilizar para producir un anticuerpo de la invención en un sistema de expresión adecuado. El término «sistema de expresión» significa una célula hospedadora y un vector compatible en condiciones adecuadas, p. ej., para la expresión de una proteína codificada por el ADN foráneo que lleva el vector y que se introduce en la célula hospedadora.

- 30 Los sistemas de expresión comunes incluyen células hospedadoras y vectores plasmídicos de *E. coli*, células hospedadoras de insectos y vectores de Baculovirus, y células hospedadoras y vectores de mamíferos. Otros ejemplos de células hospedadoras incluyen, sin limitación células procariontes (tales como bacterias) y células eucariontes (tales como células de levadura, células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, etc.). Los ejemplos específicos incluyen *E. coli*, las levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, las líneas celulares de mamíferos (p. ej., células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.), así como cultivos de células de mamíferos primarios o establecidos (p. ej., producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen la célula SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), la célula P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), la célula CHO en la que un gen de dihidrofolato reductasa (denominado en la presente memoria «gen DHFR») presenta defecto (Urlaub G et al; 1980), la célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata (ATCC CRL1662, denominada en la presente memoria «célula YB2/0») y similares.

- 45 El presente texto también describe un método para producir una célula hospedadora recombinante que expresa un anticuerpo según la invención, dicho método comprende las etapas de: (i) *introducir in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector tales como se describieron anteriormente en una célula hospedadora competente, (ii) *cultivar in vitro* o *ex vivo* la célula hospedadora recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo. Dichas células hospedadoras recombinantes se pueden utilizar para la producción de anticuerpos de la invención.

Métodos para producir anticuerpos de la invención

- 50 Los anticuerpos de la invención se pueden producir mediante cualquier técnica conocida en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, ya sea sola o en combinación.

Al conocer la secuencia de aminoácidos del anticuerpo deseado, un experto en la técnica puede producir fácilmente dichos anticuerpos mediante técnicas estándares de producción de polipéptidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar al utilizar un método en fase sólida conocido, preferiblemente al utilizar un aparato de síntesis peptídica disponible en el mercado (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y seguir las instrucciones del

fabricante. Alternativamente, los anticuerpos de la invención se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden obtener como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican para los anticuerpos en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en hospedadores eucariontes o procariontes adecuados que expresarán los anticuerpos deseados, de los cuales se pueden aislar posteriormente utilizando técnicas conocidas.

En particular, el presente texto describe, además, un método para producir un anticuerpo de la invención, cuyo método comprende las etapas de: (i) cultivar una célula hospedadora transformada descrita anteriormente en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho anticuerpo; y (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

Los anticuerpos de la invención pueden separarse de forma adecuada del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía por afinidad.

El Fab de la presente invención se puede obtener al tratar un anticuerpo que hace reacción específicamente con HER3 con una proteasa, papaína. Además, el Fab se puede producir al insertar ADN que codifica para el Fab del anticuerpo en un vector para un sistema de expresión procarionte, o para un sistema de expresión eucarionte, e introducir el vector en un procarionte o eucarionte (según corresponda) para expresar el Fab.

El F(ab')₂ de la presente invención se puede obtener al tratar un anticuerpo de la invención con una proteasa, pepsina. Además, el F(ab')₂ se puede producir al unir el Fab' descrito más adelante a través de un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

El Fab' de la presente invención se puede obtener al tratar un F(ab')₂ de la invención con un agente reductor, ditiotreitól. Además, el Fab' se puede producir al insertar ADN que codifica para el fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para un procarionte, o un vector de expresión para un eucarionte, e introducir el vector en un procarionte o eucarionte (según corresponda) para llevar a cabo su expresión.

El scFv de la presente invención se puede producir al obtener ADN_c que codifica para los dominios VH y VL, según se describieron anteriormente, construir el ADN que codifica para scFv, insertar el ADN en un vector de expresión para un procarionte, o un vector de expresión para un eucarionte, y luego introducir el vector de expresión en un procarionte o eucarionte (según corresponda) para expresar el scFv.

Anticuerpos homólogos

En otra realización adicional, un anticuerpo de la invención tiene secuencias nucleotídicas de región variable de cadena pesada y ligera, o secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y ligera que son homólogas a las secuencias nucleotídicas o de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente memoria, y en las que los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseada de los anticuerpos anti-HER3 de la invención.

Por ejemplo, el presente texto describe un anticuerpo (o una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno de este) que comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende:

- una H-CDR1 que tiene al menos 90 % o 95 % de identidad con la secuencia que se establece en el SEQ ID NO: 1,
- una H-CDR2 que tiene al menos 90 % o 95 % de identidad con la secuencia que se establece en el SEQ ID NO: 2,
- una H-CDR3 que tiene al menos 90 % o 95 % de identidad con la secuencia que se establece en el SEQ ID NO: 3, y
- que se une específicamente a HER3 y/o el complejo HER2-HER3 con sustancialmente la misma afinidad que un anticuerpo que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende el SEQ ID NO: 1 para H-CDR1, el SEQ ID NO: 2 para H-CDR2 y el SEQ ID NO: 3 para H-CDR3, y más preferiblemente, con sustancialmente la misma afinidad que uno de los siguientes anticuerpos: mAb H3A-32, mAb H3A-76, mAb H3A-81, mAb H4B-05 y mAb H4B-121, según se describieron anteriormente.

La afinidad de unión se puede medir utilizando ensayos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, el análisis Biacore.

En una realización, el presente texto describe anticuerpos homólogos que se unen a HER3 y/o el complejo HER3/HER2 humano con una K_D de 10 μM o menor, 1 μM o 100 nM o menor. Según se usa en la presente memoria, el término K_D pretende hacer referencia a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación entre K_d y K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para anticuerpos se pueden determinar utilizando métodos establecidos en la técnica. Un método para determinar la K_D de un anticuerpo es

mediante el uso de resonancia de plasmones superficiales o mediante el uso de un sistema de biosensor tal como un sistema Biacore®.

En algunas realizaciones específicas, los anticuerpos descritos anteriormente tienen, de forma ventajosa, actividad inhibidora o neutralizante de HER3.

- 5 Según se usa en la presente, un anticuerpo que inhibe la actividad biológica de HER3 es un anticuerpo que inhibe la formación del heterodímero que comprende HER3, en particular el complejo HER2-HER3, según se mide, por ejemplo, en el ensayo T-FRET.

En un ejemplo adicional, el presente texto describe un anticuerpo (o una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno de este) que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de
10 cadena ligera, en donde: la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 7, el SEQ ID NO: 14 y el SEQ ID NO: 21; la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a una secuencia de
15 aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 8, el SEQ ID NO: 15, el SEQ ID NO: 22, el SEQ ID NO: 27 y el SEQ ID NO: 30; el anticuerpo se une específicamente a HER3 y/o el complejo HER2-HER3 con sustancialmente la misma afinidad que un anticuerpo que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende el SEQ ID NO: 1 para H-CDR1, el SEQ ID NO: 2 para H-CDR2 y el SEQ ID NO: 3 para H-CDR3, y más preferiblemente, con sustancialmente la misma afinidad que uno de los siguientes anticuerpos: mAb H3A-32, mAb H3A-76, mAb H3A-81, mAb H4B-05 y mAb H4B-121, según se describieron anteriormente.
20 En un ejemplo adicional, el presente texto describe un anticuerpo (o una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno de este) que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde: la región variable de cadena pesada se codifica a partir de una secuencia de nucleótidos que es al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 9, el SEQ ID NO: 16 y el SEQ ID NO: 23; la región variable de cadena ligera se codifica a partir de la secuencia de nucleótidos que es al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 10, el SEQ ID NO: 17, el SEQ ID NO: 24, el SEQ ID NO: 28 y el SEQ ID NO: 31; el anticuerpo se une específicamente a HER3 y/o el complejo HER2-HER3 con sustancialmente la misma afinidad que un anticuerpo que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende el SEQ ID NO: 1 para H-CDR1, el SEQ ID NO: 2 para H-CDR2 y el SEQ ID NO: 3 para H-CDR3, y más preferiblemente, con sustancialmente la misma afinidad que uno de los siguientes anticuerpos: mAb H3A-32, mAb H3A-76, mAb H3A-81, mAb H4B-05 y mAb H4B-121, según se describieron anteriormente.
25
30

El anticuerpo descrito en el presente texto también abarca un anticuerpo que se une específicamente a HER3 y/o el complejo HER2-HER3 con sustancialmente la misma afinidad que un anticuerpo que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende el SEQ ID NO: 1 para H-CDR1, el SEQ ID NO: 2 para H-CDR2 y el SEQ ID NO: 3 para H-CDR3, y más preferiblemente, con sustancialmente la misma afinidad que uno de los siguientes anticuerpos: mAb H3A-32, mAb H3A-76, mAb H3A-81, mAb H4B-05 y mAb H4B-121, según se describieron anteriormente, y en donde 1, 2 o 3 aminoácidos se han sustituido en H-CDR1, H-CDR2 o H-CDR3 en comparación con el SEQ ID NO: 1, el SEQ ID NO: 2 y el SEQ ID NO: 3, respectivamente.
35

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de VH y/o VL pueden ser idénticas excepto por una sustitución de aminoácido en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácido. Un anticuerpo que tiene regiones de VH y VL que tienen identidad alta (es decir, 90 % o mayor) con respecto a las regiones de VH y VL del SEQ ID NO: 7, el SEQ ID NO: 14 o el SEQ ID NO: 21 y el SEQ ID NO: 8, el SEQ ID NO: 15, el SEQ ID NO: 22, el SEQ ID NO: 27 o el SEQ ID NO: 30, respectivamente, se puede obtener mediante mutagénesis (p. ej., mutagénesis dirigida a sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican para el SEQ ID NO: 9, el SEQ ID NO: 16 o el SEQ ID NO: 23 y el SEQ ID NO: 10, el SEQ ID NO: 17, el SEQ ID NO: 24, el SEQ ID NO: 28 y el SEQ ID NO: 31 respectivamente, con posterior evaluación del anticuerpo codificado alterado para determinar la función conservada (es decir, las funciones establecidas anteriormente) utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente memoria.
40
45

Según se usa en la presente memoria, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas que comparten las secuencias, (es decir, % de identidad = n° de posiciones idénticas/ n° total de posiciones x 100), teniendo en cuenta la cantidad de huecos y la longitud de cada hueco, que se deben introducir para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse utilizando un algoritmo matemático, según se describe más adelante.
50
55

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:1 1-17, 1988), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) usando una tabla de peso de residuo PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización

de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman and Wunsch (J. Mol. 48:444-453, 1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de programa informático GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando ya sea una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Anticuerpos con modificaciones conservadoras

En determinadas realizaciones, un anticuerpo descrito en el presente texto tiene una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR tienen secuencias de aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos descritos en la presente memoria o modificaciones conservadoras de estos, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-HER3 de la invención. Por consiguiente, se describe un anticuerpo recombinante aislado, o una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno de este, que consiste en una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3, en donde:

la secuencia de aminoácidos de H-CDR1 se establece como el SEQ ID NO: 1 y modificaciones conservadoras de esta; la secuencia de aminoácidos de H-CDR2 se establece como el SEQ ID NO: 2 y modificaciones conservadoras de esta; la secuencia de aminoácidos de H-CDR3 se establece como el SEQ ID NO: 3, y modificaciones conservadoras de este;

la secuencia de aminoácidos de L-CDR1 se selecciona del grupo que consiste en el SEQ ID NO:4, el SEQ ID NO:11, el SEQ ID NO:18, el SEQ ID NO:25 y el SEQ ID NO:29 y modificaciones conservadoras de estos;

la secuencia de aminoácidos de L-CDR2 se selecciona del grupo que consiste en el SEQ ID NO:5, el SEQ ID NO:12 y el SEQ ID NO:19 y modificaciones conservadoras de estos; la secuencia de aminoácidos de L-CDR3 se selecciona del grupo que consiste en el SEQ ID NO:6, el SEQ ID NO: 13, el SEQ ID NO:20 y el SEQ ID NO:26;

el anticuerpo se une específicamente a HER3 y/o el complejo HER2-HER3 con sustancialmente la misma afinidad que un anticuerpo que comprende una cadena pesada con CDR a saber a continuación, el SEQ ID NO: 1 para H-CDR1, el SEQ ID NO: 2 para H-CDR2 y el SEQ ID NO: 3 para H-CDR3, y más preferiblemente, con sustancialmente la misma afinidad que uno de los siguientes anticuerpos: mAb H3A-32, mAb H3A-76, mAb H3A-81, mAb H4B-05 y mAb H4B-121, según se describieron anteriormente.

Según se usa en la presente, el término «modificaciones de secuencia conservadoras» pretende hacer referencia a modificaciones de aminoácido que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos. Las modificaciones se pueden introducir en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándares conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas en que el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención se pueden reemplazar con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral, y el anticuerpo alterado se puede evaluar para determinar su función conservada utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente memoria.

Anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos anti-HER3 de la invención

En otra realización, el texto describe un anticuerpo que se une al mismo epítipo que los diversos anticuerpos anti-HER3 específicos de la invención descritos en la presente memoria y, más preferiblemente, con sustancialmente la misma afinidad que uno de los siguientes anticuerpos: mAb H3A-32, mAb H3A-76, mAb H3A-81, mAb H4B-05 y mAb H4B-121, según se describieron anteriormente.

Todos los anticuerpos descritos en los Ejemplos que son capaces de unirse específicamente al dominio extracelular HER3 de HER3 se unen a los mismos epítopos con afinidad elevada, dicho epítipo está comprendido entre los aminoácidos 20 a 643 de HER3 (SEQ ID NO: 32), preferiblemente el epítipo está comprendido entre los aminoácidos 214 a 231 de HER3 (SEQ ID NO: 33) y/o los aminoácidos 343 a 357 (SEQ ID NO: 34), preferiblemente el epítipo está comprendido entre los aminoácidos 342 a 357 de HER3 (SEQ ID NO: 35)

El anticuerpo anti-HER3 de la invención se une al epítipo que está comprendido entre los aminoácidos 352 a 357 de HER3 (SEQ ID NO: 36).

El epítipo que está comprendido entre los aminoácidos 352 a 357 de HER3 (SEQ ID NO: 36) no está en el sitio de unión de heregulina a HER3.

Tabla 9: Secuencias de aminoácidos en las que están comprendidos los epítipos Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de HER3 humano 20-643; P21860 Uniprot)	SEVGNSQAVCPGTNLGLSVTGDAENQYQTLKLYERCEVVMGNLEIVLTG HNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVM LNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDA EIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGESEDQTLTKTICAPQCNGHCFGP NPNQCCCHDECAGGCSGPQDQDCFACRHFNDGACVPRCPQPLVYNKLT QLEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSVVRACPPDKMEVDKNGLKM CEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNG DPWHKIPALDPEKLNVRFTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVSFVSNLTTIGGRS LYNRGFSLLIMKLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRLCYHHSNLNWKVLR GPTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKVCPLCSCSSGGCWGPQCLSCRNYS RGGVCVTHCNFLNGEPREFAEAEFCFSCHPECQPMEGTATCNGSGSDTC AQCAHFRDGPCHVSSCPHGVLAGKPIYKYPDVQNECRPCHENCTQGCK GPELQDCLGQTLVLIGKTHLT (SEQ ID NO: 32)
---	--

5

Secuencia de aminoácidos de HER3 humano 214-231; P21860 Uniprot)	GGCSGPQDQDCFACRHFN (SEQ ID NO: 33)
--	------------------------------------

Secuencia de aminoácidos del HER3 humano 343-357; P21860 Uniprot)	DFLITGLNGDPWHKI (SEQ ID NO: 34)
Secuencia de aminoácidos del HER3 humano 342-358; P21860 Uniprot)	LDLITGLNGDPWHKIP (SEQ ID NO: 35)
Secuencia de aminoácidos del HER3 humano 352-357; P21860 Uniprot)	DPWHKI (SEQ ID NO: 36)

10 Por consiguiente, se pueden identificar anticuerpos adicionales en función de su capacidad para competir de forma cruzada (p. ej., para inhibir de forma competitiva la unión de, en una manera estadísticamente significativa) con otros anticuerpos de la invención en ensayo de unión a HER3 estándares. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de anticuerpos de la presente invención a HER3 humano demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con dicho anticuerpo por la unión a HER3 humano; dicho anticuerpo, según la teoría no limitante, puede unirse al mismo epítipo o a uno relacionado (p. ej., uno estructuralmente similar o espacialmente próximo) en HER3 humano como el anticuerpo con el cual compite. Por lo tanto, otro aspecto del presente texto describe anticuerpos que se unen al mismo antígeno que, y compiten con, los anticuerpos descritos en mediante secuencia. En una realización determinada, el anticuerpo que se une al mismo epítipo en HER3 humano que los anticuerpos de la presente invención es un anticuerpo recombinante humano. Dichos anticuerpos recombinantes humanos se pueden preparar y asilar según se describe en los Ejemplos.

Manipulación del marco o Fc

Los anticuerpos manipulados de la invención incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones en los residuos del marco dentro de VH y/o VL, p. ej., para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, dichas modificaciones en el marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia es «retromutar» uno o más residuos del marco hasta la secuencia de línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que se ha experimentado una mutación somática puede contener residuos de marco que difieren con respecto a la secuencia de la línea germinal de la cual se derivó el anticuerpo. Dichos residuos se pueden identificar al comparar las secuencias del marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de la cual se derivó el anticuerpo. Para hacer que las secuencias de la región de marco vuelvan a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden «retromutar» hasta la secuencia de línea germinal, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR. También se pretende que dichos anticuerpos «retromutados» estén comprendidos por la invención. Otro tipo de modificación de marco implica mutar uno o más residuos dentro de la región de marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para retirar los epítomos para linfocitos T y reducir, de esta manera, la potencial inmunogenicidad del anticuerpo. Esta estrategia también se denomina «desinmunización» y se describe más detalladamente en la publicación de patente estadounidense N.º 20030153043 de Carr et al.

Además o alternativamente a las modificaciones hechas dentro de las regiones de marco o CDR, los anticuerpos de la invención se pueden manipular para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como semivida en suero, fijación en complemento, unión a receptor Fc y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (p. ej., se pueden acoplar uno o más restos químicos al anticuerpo) o se puede modificar para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de manera que la cantidad de residuos de cisteína en la región bisagra se altere, p. ej., aumente o disminuya. Esta estrategia se describe adicionalmente en la patente estadounidense N.º 5 677 425 de Bodmer et al. La cantidad de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el montaje de las cadenas ligera y pesada, o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región bisagra Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introduce una o más mutaciones de aminoácido en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de manera que el anticuerpo tenga una unión a la proteína A de Staphylococcal (SpA) deteriorada con respecto a la unión a SpA unión del dominio Fc-bisagra natural. Esta estrategia se describe con mayor detalle en la patente estadounidense n.º 6 165 745 de Ward et al.

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Existen diversas estrategias posibles. Por ejemplo, se puede introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, según se describe en la patente estadounidense n.º 6 277 375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión a receptor de recuperación tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, según se describe en las patentes estadounidenses núms. 5 869 046 y 6 121 022 de Presta et al.

En otras realizaciones adicionales, la región Fc se altera al reemplazar al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos se pueden reemplazar con un residuo de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero conserve la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo primario. El ligando efector con respecto al cual se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Esta estrategia se describe más detalladamente en las patentes estadounidenses N.º 5 624 821 y 5 648 260, ambas de Winter et al.

En otra modalidad, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos se pueden reemplazar con un residuo de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo presente unión a C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o suprimida. Esta estrategia se describe con mayor detalle en la patente estadounidense n.º 6 194 551 de Idusogie et al.

En otra modalidad, uno o más residuos de aminoácidos se alteran para alterar así la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Esta estrategia se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al.

En otra modalidad adicional, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo con un receptor Fc mediante la modificación de uno o más aminoácidos. Esta estrategia se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, se han mapeados los sitios de unión en la

IgG1 humana para FcγRI, FcγII, FcγRIII y FcRn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R. L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604, WO2010106180).

En otra modalidad adicional, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, al alterar uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se puede realizar una o más sustituciones de aminoácidos que resultan en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de marco de región variable para eliminar así la glicosilación en dicho sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Esta estrategia se describe con mayor detalle en las patentes estadounidenses núms. 5 714 350 y 6 350 861 de Co et al.

Además o alternativamente, se puede producir un anticuerpo que tenga un tipo de glicosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado o no fucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosilados o ninguno o un anticuerpo que tenga más estructuras GlcNAc bisectantes. Se ha demostrado que estos patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Estas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr a través, por ejemplo, de la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descrito células con maquinaria de glicosilación alterada y se pueden utilizar como células hospedadoras en las cuales se pueden expresar los anticuerpos recombinantes de la invención para producir así un anticuerpo con glicosilación modificada. Por ejemplo, EP 1 176 195 de Hang et al. Describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica para una fucosil transferasa, de manera que los anticuerpos expresados en dicha línea celular exhiben hipofucosilación o carecen de residuos fucosilados. Por lo tanto, en una realización, los anticuerpos de la invención se pueden producir mediante expresión recombinante en una línea celular que exhibe un patrón de hipofucosilación o no fucosilación, por ejemplo, una línea celular de mamífero con expresión deficiente del gen FUT8 que codifica para la fucosiltransferasa. La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea celular CHO variante, las células Lec13, con capacidad reducida para acoplar fucosa a carbohidratos enlazados a Asn(297), que también resulta en la hipofucosilación de anticuerpos expresados en dicha célula hospedadora (véase también Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al. Describe líneas celulares manipuladas para expresar glicosil transferasas que modifican glicoproteínas (p. ej., beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares manipuladas exhiben estructuras GlcNAc bisectantes aumentadas que resultan en una actividad ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180). Eureka Therapeutics describe, además, células de mamífero CHO manipuladas genéticamente capaces de producir anticuerpos con un patrón de glicosilación alterado carentes de residuos fucosilados (<http://www.eurekainc.com/a&boutus/companyoverview.html>). Alternativamente, los anticuerpos de la invención se pueden producir en levaduras u hongos filamentosos manipulados para tener un patrón de glicosilación similar al de mamíferos y capaces de producir anticuerpos que carecen de fucosa como patrón de glicosilación (véase, por ejemplo EP1297172B1).

Otra modificación de los anticuerpos en la presente memoria que se contempla en la invención es la pegilación. Un anticuerpo se puede pegar, por ejemplo, para aumentar la semivida biológica (p. ej., en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo o fragmento de este, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster o aldehído reactivo derivado de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se acoplan al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Según se usa en la presente memoria, el término «polietilenglicol» pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivar otras proteínas, tal como mono (C1- C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas modalidades, el anticuerpo que se pegará es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegar proteínas se conocen en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, EP O 154 316 de Nishimura et al. y EP O 401 384 de Ishikawa et al.

Otra modificación de los anticuerpos que se contempla en la invención es un conjugado o una proteína de fusión de al menos la región de unión a antígeno del anticuerpo de la invención con proteína sérica, tal como seroalbúmina humana o un fragmento de esta para aumentar la semivida de la molécula resultante. Dicha estrategia se describe, por ejemplo, en Ballance et al. EP0322094.

Otra posibilidad es una fusión de al menos la región de unión a antígeno del anticuerpo de la invención con proteínas capaces de unirse a proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana para aumentar la semivida de la molécula resultante. Dicha estrategia se describe, por ejemplo, en Nygren et al., EP O 486 525.

Usos terapéuticos de los anticuerpos de la invención

Un objeto adicional de la invención proporciona un anticuerpo anti-HER3 para uso como fármaco.

La invención se refiere al uso de un anticuerpo anti-HER3 según la invención como fármaco.

Según se describió anteriormente, se sabe que HER3 tiene una función clave en el cáncer.

5 Por lo tanto, el presente texto describe métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer u otros trastornos relacionados donde se ha demostrado que el complejo HER2-HER3 y/o HER3 constituye una diana terapéutica.

Por consiguiente, la invención se refiere a un anticuerpo de la invención para uso en el tratamiento del cáncer.

El presente texto también describe el uso de un anticuerpo anti-HER3 según la invención en la preparación de un fármaco útil para el tratamiento del cáncer. El texto también describe un método para tratar el cáncer que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesita un anticuerpo de la invención.

10 Además, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende dichos anticuerpos de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por lo tanto, los anticuerpos de la invención opcionalmente se pueden combinar con matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar las composiciones terapéuticas.

15 «Farmacéuticamente» o «farmacéuticamente aceptable» hace referencia a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras inapropiadas cuando se administran a un mamífero, especialmente un humano, según corresponda. Un vehículo farmacéuticamente aceptable hace referencia a una carga, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo.

20 La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente de la afección que se tratará, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para una administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y similares.

25 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que se puede inyectar. Estos pueden ser, en particular, disoluciones salinas, estériles, isotónicas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o disolución salina fisiológica, permite la constitución de disoluciones inyectables.

30 Las dosis utilizadas para la administración se pueden adaptar en función de diversos parámetros y, en particular, en función del modo de administración utilizado, de la patología relevante o, alternativamente, de la duración del tratamiento deseada.

Para preparar composiciones farmacéuticas, se puede disolver o dispersar una cantidad eficaz del anticuerpo en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

35 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen dispersiones o disoluciones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o disoluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida en la medida en que exista la posibilidad de colocarla en una jeringa fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe preservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

40 Las disoluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada de forma adecuada con un tensioactivo, como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de estos, así como en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

45 Un anticuerpo de la invención se puede formular en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de estos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, al mantener el tamaño de partícula necesario en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

5 La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, se preferirá incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

10 Las disoluciones inyectables estériles se preparan al incorporar los compuestos activos en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con varios de los ingredientes adicionales enumerados anteriormente, según sea necesario, y posteriormente someterlos a esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan al incorporar los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la
15 preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración de estos.

También se contempla la preparación de disoluciones más o altamente concentradas para inyección directa, donde se prevé el uso de DMSO como disolvente para resultar en una penetración extremadamente rápida que suministra
20 concentraciones altas de los agentes activos a un área tumoral pequeña.

Tras la formulación, las disoluciones se administrarán en un modo compatible con la formulación de dosificación y en la cantidad que resulte terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

25 Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución se debería tamponar de manera adecuada, si es necesario, y el diluyente líquido se debería volver isotónico en primer lugar con disolución salina o glucosa suficiente. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos para los expertos en la técnica en virtud de la presente
30 descripción. Por ejemplo, se podría disolver una dosificación en 1 ml de disolución de NaCl isotónica y agregarse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio propuesto de la infusión (véase, por ejemplo, «Remington's Pharmaceutical Sciences», 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna de variación en la dosificación se producirá según la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración podrá, en cualquier caso, determinar la dosis adecuada para el sujeto individual.

35 Los anticuerpos de la invención se pueden formular dentro de una mezcla terapéutica que comprende alrededor de 0,0001 a 1,0 miligramos, o alrededor de 0,001 a 0,1 miligramos, o alrededor de 0,1 a 1,0 o incluso alrededor de 10 miligramos por dosis o similar. También se pueden administrar múltiples dosis.

Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p. ej., comprimidos u otros sólidos para
40 administración oral; cápsulas de liberación temporizada; y cualquier otra forma utilizada actualmente.

En determinadas realizaciones, se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción de los anticuerpos en células hospedadoras. Los expertos en la técnica conocen sobre la formación y uso de liposomas y/o nanopartículas.

45 Las nanocápsulas pueden generalmente atrapar compuestos de modo estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debido a una sobrecarga polimérica intracelular, se diseñan partículas ultrafinas (con un tamaño de alrededor de 0,1 μm) en general utilizando polímeros capaces de degradarse in vivo. Las nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradables que cumplen con estos requisitos se contemplan para uso en la presente invención y dichas partículas se pueden producir fácilmente.

50 Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas multilamelares concéntricas de doble capa (también denominadas vesículas multilamelares (MLV, por sus siglas en inglés)). Las MLV generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 μm . La sonicación de MLV resulta en la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV, por sus siglas en inglés) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una disolución acuosa en el núcleo. Las características físicas de los liposomas dependen del Ph, la resistencia iónica y la presencia de cationes divalentes.

El texto también describe kits que comprenden al menos un anticuerpo de la invención. Los kits que contienen anticuerpos de la invención se utilizan en ensayos terapéuticos.

La invención se ilustrará en mayor detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en ningún modo como limitantes del alcance de la presente invención.

5 Figuras

La figura 1 muestra el resultado de la especificidad de unión por Fago-ELISA para diversos anticuerpos según la invención.

La figura 2 muestra un ejemplo de los resultados del ELISA competitivo. El ELISA competitivo se llevó a cabo mediante una competencia por la unión a HER3 (ErbB3) entre fago-scFv de H3A-81 y sus otros Fab humanos. La unión residual del fago-scFv-H3A-81 a una concentración de 2µg/ml de Fab utilizados como competidor se asignó en porcentaje. Se utilizó un Fab irrelevante (clon H3A-02) como testigo negativo. El Fab H3A-81 se utilizó como testigo positivo (competencia consigo mismo: fago-scFv-H3A-81 contra Fab-H3A-81).

La figura 3 muestra los resultados de las curvas de unión de ELISA para la IgG humana purificada de la invención. El clon H3A-02 es un anticuerpo irrelevante utilizado como testigo negativo.

La figura 4 muestra las curvas de unión de H4B-121 en comparación con otros dos anticuerpos anti-HER3 (Ab n.º 6 y U1-59).

La figura 5 muestra la reactividad de los anticuerpos IgG humanos purificados de la invención para HER3 humano con respecto a HER3 de ratón. Los anticuerpos D, E, G y H son anti-HER3 testigos positivos.

La figura 6 muestra la reactividad con dependencia de dosis del anticuerpo H4B-121 para HER3 humano y HER3 de ratón.

Las figuras 7A-F muestran el perfil de unión específico por citometría de flujo de la IgG H3A-81, H3A-32, H4B-05, H3A-76 y H4B-121 humana purificada para natural (A), EGFR (B), HER2 (C), EGFR/HER4 (D), HER3 (E) y el complejo HER2/HER3 (F) transfectado en células NIH 3T3. T es el clon H3A-02 testigo negativo.

La figura 8 muestra el experimento de competencia por FACS entre el anticuerpo específico para HER3 H4B-121, dos anti-HER3 adicionales (D y G), usados como anticuerpos testigo, y heregulina en células SKBR3.

La figura 9 muestra los resultados del ensayo TR-FRET para el análisis de heterodimerización HER2-HER3 en células NIH-3T3 transfectadas. Los anticuerpos anti-HER2 trastuzumab y pertuzumab se utilizaron como testigo positivo. El mAb Px irrelevante fue el testigo negativo.

La figura 10 muestra el análisis de epítomos reconocidos por el anticuerpo H4B-121. La unión puntual se midió mediante cuantificación de píxeles de unión de H4B-121 a HER3 (programa informático peptides 5imageJ).

La figura 11 identifica los residuos que contribuyen al punto (SCR, por sus siglas en inglés) en el receptor HER3 que interactúan con el anticuerpo H4B-121.

Las figuras 12A-B muestran la inhibición de la progresión tumoral mediante el anticuerpo H4B-121 en ratones lampiños con xenoinjertos con células cancerosas epidermoides A431 (A) y la correspondiente curva de supervivencia de Kaplan-Meier (B). La expresión relativa de los receptores EGFR, HER2 y HER3 en la superficie de las células A431 también se indica.

Las figuras 13 muestran la inhibición de la progresión tumoral mediante el anticuerpo H4B-121 en ratones lampiños con xenoinjertos con células cancerosas pancreáticas BxPC3 (A) y la correspondiente curva de supervivencia de Kaplan-Meier (B). La transferencia interna en la figura 13B muestra el nivel de fosforilación del receptor HER3 en los xenoinjertos de BxPC3 extraídos de los ratones tratados con vehículo o H4B-121.

La figura 14A muestra la inhibición inducida por H4B-121 de la internalización de HER3 en el carcinoma pancreático BxPC3 mediante transferencia western y la figura 14B cuantifica la internalización de HER3 inducida por el anticuerpo dependiente del tiempo.

EJEMPLO

45 Especificidad por Fago-ELISA

Se sometió a barrido una biblioteca de fagos de scFv humano con respecto a la proteína HER3-Fc (R&D Systems) para seleccionar anticuerpos anti-HER3. Se seleccionaron 10⁵ clones.

Los que se unieron a scFv se evaluaron mediante el ensayo fago-ELISA para determinar la especificidad para HER3 con respecto a otro receptor HER (HER4, por ejemplo aquí). La expresión de scFv en fagos y el ensayo fago-ELISA fueron similares, según se describió anteriormente. Cada sobrenadante de fagos-scFv se agregó a los pocillos de placa de microtitulación previamente recubiertos con HER3-Fc humano, HER4-Fc humano (dominio extracelular ErbB3/HER3 humano recombinante o quimera ErbB4/HER4 Fc, R&D Systems) o seroalbúmina bovina. HER4-Fc y BSA se utilizaron como testigos negativos. Según se muestra en la figura 1, se aislaron diversos fagos-scFv que exhibieron unión específica para HER3 con respecto a HER4 a partir de la biblioteca de scFv humano.

Análisis de las secuencias de los que se unieron a scFv

Se determinó la secuencia de ADN de los que se unieron a scFv. El análisis de las secuencias de ADN de scFv exhibió que 57/105 clones eran únicos. Además, este análisis de diversidad genética después de la sección muestra un enriquecimiento preferencial del clon H3A-76 (34/105). Otros cuatro clones H3A-32 (2/105), H3A-81, H4B-05 (2/105) y H4B-121 comparten las tres CDR-H (SEQ ID NO:1 para H-CDR1; SEQ ID NO: 2 para H-CDR2; SEQ ID NO: 3 para H-CDR3) con el clon H3A-76.

La secuencia de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (VH) y ligera (VL) para los clones H3A-32 H3A-76, H3A-81, H4B-05 y H4B-121 se establece en las Tablas 2 a 6. Los clones H3A-32 y H3A-81 tienen el dominio VH entero idéntico y H4B-05 y H4B-121 también tienen el mismo dominio VH. Las Tablas 2 a 6 muestran las secuencias de aminoácidos de la CDR de las regiones variables de cadena pesada (CDR-H) y ligera (CDR-L).

Construcción de fragmentos Fab anti-HER3 humanos, producción y caracterización de unión

Conversión a formato Fab

Los clones H3A-32, H3A-76, H3A-81, H4B-05, H4B-121 se convirtieron a formato Fab. Las regiones VH y VL se subclonaron en un vector de expresión bacteriano bicistrónico que permite la expresión periplasmática del fragmento Fab con una etiqueta V5 para la detección y una etiqueta 6xHis en el extremo C para la purificación. Se utilizó pMG92 para clones con una cadena ligera kappa y se utilizó pMG94 para clones con una cadena ligera lambda. Los dominios VH se clonaron utilizando el sitio de restricción NcoI/XhoI y los dominios VL se clonaron utilizando el sitio de restricción BamHI/Sall. La expresión de Fabs se llevó a cabo en la cepa de *E coli* HB2151 con inducción por IPTG (0,5Mm) durante 16 horas a 20 °C. Los cultivos celulares se recogieron y las fracciones periplasmáticas se prepararon mediante protocolos estándares. La purificación se llevó a cabo utilizando resina Ni-NTA (Qiagen). La expresión de Fab a partir de estos sistemas produce de 50-200µg dependiendo del Fab.

Unión a Fab

Los Fab humanos purificados a diversas concentraciones se incubaron durante 2 horas a 37 °C en pocillos recubiertos con 250ng de HER3-Fc (o HER4-Fc). Los Fab unidos se detectaron utilizando el anticuerpo anti-V5 etiquetado con HRP (Invitrogen). El revelado se llevó a cabo a 450nm en presencia de TMB (Sigma). Los Fab se evaluaron simultáneamente para la unión a HER3-Fc, HER4-Fc y a seroalbúmina bovina como testigo. Todos los clones de Fab descritos anteriormente exhibieron una unión específica alta a HER3 sin ninguna reactividad cruzada con HER4.

Unión competitiva de los anticuerpos anti-HER3 humanos

Se puede determinar el epítipo de HER3 al que se unió cada anticuerpo de la invención mediante análisis de unión competitiva. El objetivo era agrupar a los anticuerpos anti-HER3 en función de su capacidad para bloquear la unión entre sí. La competencia por la unión a HER3 de cada anti-HER3 entre ellos se comparó con la competencia con un anticuerpo irrelevante utilizado como testigo negativo y con la competencia con el clon de anticuerpo evaluado consigo mismo como testigo positivo. Este ensayo de unión competitiva se puede llevar a cabo en diferentes formatos del anticuerpo anti-HER3. Según se describe en este ejemplo, los experimentos competitivos se llevaron a cabo en formato fago-scFv a una concentración definida con respecto a Fab a diversas diluciones.

En resumen, se mezclaron 10^{10} de fago-scFv purificado con PEG con diversas concentraciones de Fab purificados (de 1×10^{-7} M a 2×10^{-10} M). La mezcla se agregó a los 96 pocillos de la placa de microtitulación prerrecubiertos con HER3-Fc a 50ng y se bloqueó con seroalbúmina bovina. Las placas se incubaron 2 horas a 37 °C y luego se lavaron tres veces. Los fagos-scFv unidos residuales se detectaron mediante adición del anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (GE Healthcare) durante 2 horas a 37 °C, y se revelaron a 450nm en presencia de TMB (Sigma).

La figura 2 exhibe un resumen de la competencia por la unión a HER3 entre el clon fago-scFv de H3A-81 y sus otros Fab. La unión residual del fago-scFv-H3A-81 a una concentración de 1×10^{-7} M de los Fab competidores se asignó en porcentaje. Se utilizó un Fab irrelevante, el clon H3A-02, como testigo negativo y el clon H3A-81 en formato Fab se utilizó como testigo positivo (competencia consigo mismo). Según se muestra en la Figura 2, los clones H3A-81, H4B-05, H3A-76, H3A-32 y H4B-121 compiten por la unión a HER3 con el clon H3A-81. Estos datos sugieren que

estos clones comparten el mismo epítipo o tienen en común una misma área de reconocimiento en la superficie del receptor HER3.

Construcción de IgG anti-HER3, producción y caracterización

Conversión a formato IgG

- 5 Las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes humanos se ensamblaron mediante de PCR superposición con las secuencias líderes adecuadas (líder de cadena pesada humano y líder de cadena ligera humano) y se insertaron en los vectores pMGM09-H (para expresión en la cadena pesada) y pMGM09-Lambda (para expresión en la cadena ligera lambda) o Pmgm09-Lkappa (para expresión en la cadena ligera kappa). Estos sistemas de expresión eucariontes permiten la expresión de los anticuerpos como un isotipo de IgG1 impulsado por un promotor CMV. La producción de IgG anti-HER3 se logra a través de FreeStyle MAX Expression System (Invitrogen) utilizando células 293 de riñón embrionario humano transfectado transitoriamente en suspensión en medio libre de suero. El procedimiento de expresión de IgG se llevó a cabo según el protocolo del proveedor en placas de 24 (o 6) pocillos. Siete días después de la transfección, las células se centrifugaron para recuperar los sobrenadantes que contenían anticuerpos. Estos anticuerpos anti-HER3 humanos se purificaron utilizando métodos de purificación de proteína A estándares.

Unión a IgG completamente humana

- Las IgG anti-HER3 humanas purificadas se incubaron durante 2 horas a 37 °C en pocillos recubiertos con 50ng de HER3-Fc humano (o HER4-Fc) a tres concentraciones: 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,125 µg/ml. La IgG unida se detectó mediante el uso de F(ab')₂ específico anti-IgG humana de cabra HRP-F(ab')₂ (Interchim). Todas las IgG evaluadas no exhibieron reactividad cruzada contra HER4. Según se representa en la figura 3, la IgG anti-HER3 de la invención muestra unión por afinidad diferenciada a HER3 humano y H4B-121 muestra la reactividad más intensa de este grupo de anticuerpos relacionados. El anticuerpo H4B-121 se comparó con otros dos anticuerpos anti-HER3, el Ab n.º 6 (Merrimack Pharmaceuticals) y U1-59 (Amgen/U3 Pharma- Daiichi Sankyo). Estos anticuerpos U1-59 y Ab n.º 6 se construyeron en función de la descripción de las secuencias en la patente US2008/0124345A1 y US2009/0291085A1 respectivamente. Según se muestra en la figura 4, el H4B-121 exhibe claramente mejor reactividad en comparación con el Ab n.º 6 y U1-59.

Reactividad cruzada con receptor HER3 de ratón

- La reactividad cruzada se evaluó mediante un ensayo ELISA comparativo con HER3-Fc humano y HER3-Fc de ratón inmovilizado (quimera de dominio extracelular ErbB3/HER3 Fc recombinante de ratón, R&D Systems) recubierto con 250 ng/ml. Los cinco clones de la invención, a una concentración de 1 µg/ml hicieron reacción cruzada con HER3 de ratón (Fig. 5), así como el anticuerpo Ab n.º 6. El clon H4B-121 exhibió la mejor unión en este grupo de clones y la Figura 6 ilustra la reactividad dependiente de dosis de H4B-121 con los receptores HER3 humano y de ratón. El anticuerpo testigo irrelevante H3A-02 no se unió con HER3 humano ni de ratón.

Análisis de citometría de flujo para células positivas para HER3

- 35 Se incubaron fibroblastos NIH 3T3 transfectados con HER3 y el complejo HER2/HER3 (10⁶ células) con la IgG anti-HER3 humana purificada en PBS-BSA al 0,1 % a 4 °C durante 1 hora. Después de tres lavados en PBS-BSA al 0,1 %, las células se incubaron con el fragmento Fc anti-IgG humana específico conjugado con fluoresceína (Sigma) a 4 °C en la oscuridad durante 45 minutos. A continuación, las células se lavaron tres veces y se suspendieron en PBS para análisis utilizando un citómetro de flujo EPICS (Beckman-Coulter, Fullerton, CA). Como se muestra en las Figuras 7, todas las IgG anti-HER3 humanas; H3A-32, H3A-76, H3A-81, H4B-05 y H4B-121 se unen a las células NIH 3T3 transfectadas con HER3 y HER2/HER3 (Fig. 7E y 7F), pero no a las naturales (Fig. 7A). No se observó unión con las células testigo (EGFR, HER2 y EGFR/HER4, respectivamente Fig. 7B, 7C y 7D). Tampoco se observó unión con el anticuerpo testigo negativo H3A-02 (T). Los anticuerpos de la invención se compararon con los anticuerpos U1-59 y Ab n.º 6 indicados anteriormente.

45 **Tabla 10: Resultados de perfil de unión específico por citometría de flujo**

Nombre de Ab	NIH-3T3 natural	NIH-3T3 transfectado				
		EGFR	HER2	HER3	HER2/HER3	EGFR/HER4
H3A-02	0,39 ^a	0,24	0,49	0,50	0,49	0,60
U1-59	0,45	0,25	0,42	9,32	15,5	0,59

Nombre de Ab	NIH-3T3 natural	NIH-3T3 transfectado				
		EGFR	HER2	HER3	HER2/HER3	EGFR/HER4
Ab n.º 6	0,43	0,21	0,35	7,77	14,1	0,51
H3A-32	0,47	0,26	0,44	10,5	68,8	0,53
H3A-76	0,56	0,24	0,52	11,5	66,6	0,53
H3A-81	0,55	0,26	0,50	10,6	68,5	0,53
H4B-05	0,46	0,28	0,41	7,85	13,3	0,52
H4B-121	0,70	0,33	0,56	12,3	70,4	0,67

^amedia geométrica

Competencia de unión con ligando heregulina

Se llevaron a cabo experimentos de competencia por citometría a efectos de cuantificar la capacidad de HRG para inhibir la unión del anticuerpo a HER3 en un ensayo basado en células SKBR3. Con este fin, se preincubaron 10⁵ células SKBR3 con diversas concentraciones del ligando HRG de competencia durante 1,5h sobre hielo. Después de un lavado con PBS-1 % BSA, se agregaron los anticuerpos anti-HER3 a una concentración para proporcionar una unión máxima de 50 % a cada pocillo durante 1h sobre hielo. En algunos experimentos, el ligando HRG y los anticuerpos anti-HER3 se coincubaron durante 2h sobre hielo. A continuación, las células se lavaron y se incubaron adicionalmente con una dilución 1:60 de anticuerpo secundario conjugado con FITC adecuado (Sigma) durante 45 min sobre hielo, antes del análisis de citometría en un aparato Quanta (Beckman-Coulter). El anticuerpo H4B-121, así como el anticuerpo testigo positivo D exhibieron una disminución de unión dependiente de HRG al receptor HER3, lo cual demuestra que sorprendentemente los epítomos reconocidos por estos anticuerpos podrían alterarse para la unión a anticuerpo cuando HRG induce la transconformación del receptor HER3 activo para la heterodimerización y la señalización adicional (Fig. 8). En cambio, el anticuerpo testigo positivo G no compitió con la unión de HRG. La concentración inhibidora de 50 % de unión estuvo en el intervalo de alrededor de 2,5 nM de ligando HRG. Se obtuvieron resultados similares mediante incubación secuencial o coincubación de HRG con anticuerpos.

Análisis de heterodímero HER2-HER3 mediante TR-FRET

El ensayo TR-FRET se llevó a cabo utilizando el mAAb anti-HER3 de ratón 15D4-F2 etiquetado con Lumi4-terbio criptato (donante) y el anticuerpo anti-HER2 FRP5 conjugado con el tinte d2 (aceptor) (Cisbio Bioassay). Las células se colocaron en placas a 10⁵ por pocillo en microplacas negras estériles de 96 pocillos en DMEM (sin rojo fenol) durante 24h, luego se lavaron con tampón KREBS, se fijaron en 10 % de formalina durante 2 min y se lavaron una vez con tampón KREBS. Después de la incubación con los mAAb etiquetados en tampón KREBS a 37 °C durante 6 horas, las células se lavaron 4 veces con tampón KREBS. Se midió la fluorescencia de Lumi4 Tb y d2, respectivamente, a 620 y 665 nm (60 µs de retardo, 400 µs de integración) tras excitación a 337 nm utilizando un instrumento Pherastar FS.

La fluorescencia de las diluciones en serie de los anticuerpos etiquetados con Lumi4 Tb en tampón KREBS se midió de forma simultánea en la misma placa de microtitulación, y la emisión a 665nm se graficó con respecto a la emisión a 620nm. La curva resultante se utilizó para calcular la contribución a 665nm del terbio (F665Tb) utilizando la emisión de 620nm (F620) de las muestras. La señal de TR-FRET se expresó como Delta F665(%) = 100 x Delta F665 / F665Tb, con Delta F665 = F665c - F665Tb. Las emisiones de 665nm y 620nm de las muestras se corrigieron según el fondo como F665c = F665_{muestra} - F665_{fondo} y F620c = F620_{muestra} - F620_{fondo}. Los valores de F665_{fondo} y F620_{fondo} se obtuvieron al medir la fluorescencia de una placa que contenía solo tampón de lectura. La señal de TR-FRET expresada como Delta F665(%) representa la cantidad relativa de dímeros de HER2/HER3 normalizada con respecto al nivel de HER2. Las IgG humanas de la invención se incubaron con las células NIH-3T3 transfectadas con HER2-HER3 a 0, 1, 10 y 100µg/ml. Después del tratamiento, las células se fijaron en formalina al 10 % para inmovilizar los dímeros y para evitar cualquier modificación durante la etapa de etiquetado con los anticuerpos Lumi4-Tb y d2.

El mAb Px irrelevante se utilizó como testigo negativo. Los anticuerpos anti-HER2 trastuzumab (Herceptin®; Roche/Genentech) y pertuzumab (Roche/Genentech) se utilizaron como testigo positivo. Se utilizó heregulina para confirmar su capacidad para aumentar la concentración del heterodímero HER2-HER3 en este ensayo. Como se muestra en la figura 9, el anticuerpo anti-HER3 H4B-121 inhibe la formación del heterodímero HER2-HER3 a partir de 1 µg/ml y además de modo independiente del ligando (sin estimulación con heregulina).

Mapeo de epítomos utilizando matriz de péptidos SPOT

Se obtuvieron membranas de Abimed (Langenfeld, Alemania). Se obtuvieron aminoácidos Fmoc y N-hidroxibenzotriazol de Novabiochem (Läufelfingen, Suiza). El robot ASP222 (Abimed) se utilizó para las etapas de acoplamiento. Se sintetizaron doscientos trece pentadecapéptidos superpuestos con desplazamiento de marco por tres residuos, que representan el dominio extracelular del receptor HER3, sobre membranas de celulosa. Todos los péptidos se acetilaron en su extremo N. Después de que las secuencias peptídicas se ensamblaron, los grupos protectores de cadena lateral se retiraron mediante tratamiento con ácido trifluoroacético. Después de tres lavados en tampón TBS (137mM de NaCl, 2,68mM de KCl, 50mM de Tris), la membrana se saturó con tampón TBS que contenía Tween 20 al 0,1 % (TBS-T) y leche semidescremada al 2 % durante 18h a 4 °C. Después de un lavado en TBS-T, se agregó 1 µg/ml de disolución de anticuerpo H4B-121 a la membrana durante 1h30 a 37 °C. El anticuerpo unido se detectó mediante incubación de la membrana a 37 °C durante 1 h en una dilución 1:10000 de un F(ab')₂ anti-humano conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) y posterior revelado electroquimioluminiscente. Según se muestra en la Figura 10, se reconocieron dos epítomos posibles mediante H4B-121. Una primera área está delimitada por los residuos 214-231 en el dominio 1, y se identificó un segundo péptido que comprende los residuos 343-357 en el dominio 3 del dominio extracelular de HER3. La región 342-358 (SEQ ID NO: 35) se confirmó adicionalmente en un segundo experimento mediante el uso de pentadecapéptidos superpuestos con marco desplazado por solo uno o dos residuos (Fig. 11)

Para identificar con precisión el epítipo reconocido por el anticuerpo H4B-121, se llevó a cabo el análisis de barrido de alanina Spot. Se sintetizaron treinta y nueve pentadecapéptidos correspondientes a secuencias de aminoácidos inmunorreactivas para el anticuerpo identificadas anteriormente y los quince análogos de alanina de cada péptido mediante el método Spot. La reactividad al anticuerpo de los péptidos unidos a celulosa se sometió a ensayo de manera similar, según se describió anteriormente. La reactividad de los puntos se evaluó mediante barrido de la membrana y medición de las intensidades de los puntos con el programa informático Image J 1.44 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Los residuos de contribución al punto (SCR), que pertenecen a los epítomos de HER3 reconocidos por el anticuerpo H4B-121 se identificaron en función de la capacidad de unión a anticuerpo reducida igual o superior a 20 % de dicha secuencia de péptidos no modificada. La sustitución de Asp³⁵² de los péptidos ³⁴²LDLITGLNGDPWHK³⁵⁶, ³⁴³DFLITGLNGDPWHK³⁵⁷ y ³⁴⁴FLITGLNGDPWHKIP³⁵⁸ con un residuo de alanina condujo a una disminución del 92 % en la capacidad de unión a H4B-121 (Fig. 11). De manera similar, el reemplazo de Trp³⁵⁴, His³⁵⁵ y Lys³⁵⁶ condujo a una pérdida casi completa de la reactividad del anticuerpo H4B-121, mientras que cambiar Pro³⁵³ y Ile³⁵⁷ solo demostró una disminución de 40 a 60 % en la reactividad del anticuerpo (Fig. 11). Los otros nueve reemplazos de alanina en los tres pentadecapéptidos 342-356, 343-357 y 344-358 del receptor HER3 no modificaron la capacidad de unión al anticuerpo. Por lo tanto, se determinó que el motivo de unión clave para el anticuerpo H4B-121 del dominio HER3/D3 era ³⁵²DPWHK³⁵⁷ (SEQ ID NO: 36) donde los residuos Asp³⁵², Trp³⁵⁴, His³⁵⁵ y Lys³⁵⁶ son los principales SCR. Los residuos Trp³⁵⁴, His³⁵⁵ y Lys³⁵⁶ están conservados filogenéticamente en el HER3 murino y de mono, lo cual explica por qué H4B-121 se une a HER3 de humano y murino mediante ELISA (Fig.4A) y sugiere que H4B-121 probablemente hace reacción cruzada con HER3 de mono rhesus (*Macaca mulatta*). En cambio, la alineación de secuencia con los receptores EGFR, HER2 y HER4 humanos demostró las diferencias de aminoácidos en la región HER3/D3 353-357, lo cual explica, de esta manera, por qué este anticuerpo no reconoció otros receptores de la familia HER mediante citometría de flujo. Llevamos a cabo el posicionamiento de los SCR del motivo de unión del anticuerpo H4B-121 sobre la estructura cristalográfica del receptor HER3 no alineado (pdb 1M6B). El motivo de unión de H4B-121 ³⁵²DPWHK³⁵⁷ (SEQ ID NO: 36) se proyectó en la unión entre los dominios D2 y D3, donde este motivo de unión sobresale sobre el dominio D2. En la actualidad, no se ha informado acerca de ninguna estructura de cristal del receptor HER3 unido a un ligando. Mediante homología de secuencia, el epítipo reconocido por el anticuerpo específico para HER3 H4B-121 se superpuso sobre la estructura cristalográfica del receptor HER2 unido a pertuzumab (pdb 1 S78), de esta manera, se indicó que el epítipo es accesible incluso en la conformación cerrada del receptor HER3.

Inhibición del crecimiento tumoral

Se adquirieron ratones lampiños BALB/c hembra, de 6 a 8 semanas, atímicos a Janvier and Charles Rivers Laboratories. Se inyectaron s.c. células cancerosas A431 de piel no amplificadas por *HER2/PIK3CA-wt/p53-mut* (1x10⁶) y BxPC3 no amplificadas por *HER2/PIK3CA-wt/p53-wt* (3,5x10⁶) en el extremo derecho de ratones lampiños BALB/c atímicos. Ambas expresaban el receptor HER3 a un nivel bajo (entre 10000 y 20000 receptores/célula). Además, las células cancerosas A431 secretaban el ligando HRG de HER3 y son adictas a HRG (Yonesaka, 2011).

Los ratones que portaban los tumores se aleatorizaron en diferentes grupos de tratamiento cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm³. Los ratones se trataron mediante inyecciones i.p. con NaCl 0,9 % de anticuerpo H4B-121 específico para HER3. La cantidad de anticuerpo inyectado fue de 300µg/inyección, tres veces por semana (Q2d, 15mg/kg), durante 6 semanas consecutivas. Se midieron las dimensiones de los tumores dos veces por semana con un calibre y los volúmenes se calcularon mediante la fórmula $D1 \times D2 \times D3 / 2$. La progresión tumoral se calculó utilizando la fórmula $[(\text{volumen final}) - (\text{volumen inicial})] / (\text{volumen inicial})$. Los resultados también se expresaron mediante una curva de supervivencia de Kaplan-Meier, utilizando el tiempo que llevó para que el tumor alcanzara un determinado volumen final de 2000 mm³. Un retardo de mediana se definió como el tiempo en que el 50 % de los ratones tenía un tumor que alcanzaba el volumen determinado. Como se muestra en la figura 12A, la administración de 300µg (Q2d) del anticuerpo humano H4B-121 resulta en una inhibición significativa del crecimiento tumoral. El día 31 posimplantación (correspondiente a 20 días después del inicio del tratamiento), el anticuerpo anti-HER3 H4B-121 inhibió significativamente el crecimiento tumoral en aproximadamente 53 ± 6 % en ratones con xenoinjertos con células cancerosas A431, en comparación con el testigo vehículo (Fig. 12A). El retardo de mediana para alcanzar un tamaño de tumor de 2000 mm³ aumentó a los 14 días (Fig. 12B), en relación con el tratamiento con el vehículo testigo (NaCl) (42 días) con respecto al tratamiento con H4B-121 (56 días). Como se muestra en la Figura 13A, observamos una reducción significativa 68 ± 4 % en el crecimiento tumoral de BxPC3 pancreático en ratones tratados con el anticuerpo el día 56 posimplantación del tumor (correspondiente a 26 días después del inicio del tratamiento con el anticuerpo), en relación con el tamaño del tumor medido en ratones tratados con vehículo ($P < 0,001$). Al final del experimento (135 días), el análisis de Kaplan-Meier reveló un retardo de 18 días en el tiempo de supervivencia medio del 50 % para ratones con xenoinjertos de BxPC3 pancreático tratados con el anticuerpo H4B-121 (Fig. 13B). En este caso (Fig. 13B, interior), los tumores extraídos de ratones tratados con H4B-121 demostraron una inhibición de la fosforilación de Tyr1289 HER3 y una reducción del receptor HER3, en relación con tumores extraídos de los ratones tratados con vehículo.

Inhibición de fosforilación e internalización del receptor HER3

Se agregaron quinientas mil células tumorales de BxPC3 en cada pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos durante 24h a 37 °C. Después de privación de suero durante 16 h en un medio completo de RPMI con FCS al 1 % y lavado adicional, las células se preincubaron con una concentración de 50 µg/ml de anticuerpo H4B-121, el anticuerpo Px o el anticuerpo Ab n.º 6 testigo negativo durante 1 h a 37 °C, antes del lavado y posterior estimulación o no con una dilución de 100 ng/ml de heregulina. A continuación, las células se lavaron, se rasparon y se lisaron con tampón que contenía 20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1,5 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, Triton al 1 %, glicerol al 10 %, 0,1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 100 mM de fluoruro de sodio, 1 mM de ortovanadato de sodio (Sigma-Aldrich) y un comprimido de mezcla de inhibidor de proteasa completo (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Después de un tiempo de incubación de 30 min, se retiró la fracción insoluble de las muestras mediante centrifugación y se determinaron las concentraciones de proteína en los lisados celulares mediante ensayo Bradford. Estos lisados proteicos se mezclaron directamente con tampón Laemmli (1-20 µg de proteínas totales dependiendo de la diana y las líneas celulares) y se calentaron a 95 °C durante 5 minutos. Después de la electroforesis en 7 % de SDS-PAGE en condiciones reductoras, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (Millipore) que luego se saturaron en tampón TNT (Tris 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween al 0,1 %) que contenía leche en polvo sin grasa al 5 % durante 1h a 25 °C. Los anticuerpos primarios, dirigidos a receptores cinasa o cinasas de señalización y sus formas fosforiladas, se incubaron en tampón TNT-5a% de BSA durante 18h a 4 °C. Después de cinco lavados en tampón TNT, se agregaron los anticuerpos policlonales de conejo, cabra o ratón conjugados con peroxidasa (Sigma-Aldrich), según correspondiera, en tampón TNT que contenía leche en polvo sin grasa al 5 % durante 1h a 25 °C. Después de cinco lavados en tampón TNT, las transferencias se visualizaron utilizando un sustrato quimioluminiscente (Western lightning Plus-ECL, Perkin Elmer).

De manera destacable, el anticuerpo específico para D3 H4B-121 bloque la fosforilación inducida por ligando en el residuo Tyr1289 en HER3. La inhibición de la fosforilación Akt en Ser473 y Thr308 se demostró de manera concomitante tras un tratamiento corto de 15 min de anticuerpos en células BxPC3. La fosforilación de la señalización posterior activada por AKT también fue afectada por el anticuerpo H4B-121, es decir, la inhibición de la fosforilación de la proteína fosfo-S6 ribosómica que reduce la síntesis proteica, bloqueo de la fosforilación de FoxO1a que favorece la transcripción nuclear del gen que conduce a la apoptosis y al detenimiento del ciclo celular, disminución de fosfo-MDM2 que evita la degradación de p53 e inhibición de fosfo-GSK3 que bloquea el ciclo celular.

Las células BxPC3 se analizaron para determinar la expresión en la superficie celular de los receptores HER2 y HER3 después de la exposición al anticuerpo H4B-121 durante diferentes tiempos y temperaturas. Como se muestra en la figura 14A, una incubación con anticuerpo de 2 horas de las células BxPC3 a 37 °C redujo en gran medida la expresión de HER3 en la superficie celular, pero no afectó a los receptores EGFR y HER2 (Fig. 14A). La reducción de HER3 inducida por anticuerpo se suprimió cuando las células se trataron a 4 °C, lo cual demuestra que el anticuerpo específico para HER3 H4B-121 indujo la internalización de HER3. La cuantificación de la internalización de HER3 demostró que H4B-121 es más eficaz que el Ab n.º 6 para inducir la internalización de HER3 (Fig. 14B).

REFERENCIAS

A lo largo de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la cual corresponde la presente invención.

- 5 Brady G, Jantzen HM, Bernard HU, Brown R, Schutz G, Hashimoto-Gotoh T. New cosmid vectors developed for eukaryotic DNA cloning. *Gene*. febrero de 1984;27(2):223-32.
- Campiglio M, Ali S, Knyazev PG, Ullrich A. Characteristics of EGFR family-mediated HRG signals in human ovarian cancer. *J Cell Biochem*. 15 de junio de 1999;73(4):522-32.
- 10 Campbell MR, Amin D, Moasser MM. HER3 comes of age: new insights into its functions and role in signaling, tumor biology, and cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 1 de marzo de 2010;16(5):1373-83. Publicación electrónica del 23 de febrero de 2010.
- Caron PC, Laird W, Co MS, Avdalovic NM, Queen C, Scheinberg DA. Engineered humanized dimeric forms of IgG are more effective antibodies. *J Exp Med*. 1 de octubre de 1992;176(4):1191-5.
- Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. julio de 2006;7(7):505-16.
- 15 Edge AS, Faltynek CR, Hof L, Reichert LE Jr, Weber P. Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal Biochem*. 15 de noviembre de 1981;118(1):131-7.
- Gillies SD, Morrison SL, Oi VT, Tonegawa S. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell*. julio de 1983;33(3):717-28.
- Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. mayo de 2005;5(5):341-54.
- 20 Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 30 de diciembre de 1994;1198(2-3):165-84.
- Karamouzis MV, Badra FA, Papavassiliou AG. Breast cancer: the upgraded role of HER-3 and HER-4. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(5):851-6. Publicación electrónica del 27 de diciembre de 2006.
- 25 Kim HH, Vijapurkar U, Hellyer NJ, Bravo D, Koland JG. Signal transduction by epidermal growth factor and heregulin via the kinase-deficient ErbB3 protein. *Biochem J*. 15 de agosto de 1998;334 (Pt 1):189-95.
- Kruser TJ, Wheeler DL. Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Exp Cell Res*. 15 de abril de 2010;316(7):1083-100. Publicación electrónica del 11 de enero de 2010.
- 30 Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, Nakanishi M, Arata Y, Itoh S, Nagase F, Kurosawa Y. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun*. 31 de diciembre de 1987;149(3):960-8.
- Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, Pham T, Munroe X, Hoeflich KP, Sliwkowski MX, Stern HM. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res*. 15 de julio de 2008;68(14):5878-87.
- 35 Mason JO, Williams GT, Neuberger MS. Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell*. junio de 1985;41(2):479-87.
- Menendez JA, Mehmi I, Lupu R. Trastuzumab in combination with heregulin-activated Her-2 (erbB-2) triggers a receptor-enhanced chemosensitivity effect in the absence of Her-2 overexpression. *J Clin Oncol*. 10 de agosto de 2006;24(23):3735-46.
- 40 Miyaji H, Mizukami T, Hosoi S, Sato S, Fujiyoshi N, Itoh S. Expression of human beta-interferon in Namalwa KJM-1 which was adapted to serum-free medium. *Cytotechnology*. marzo de 1990;3(2):133-40.
- Mizukami T, Itoh S. A new SV40-based vector developed for cDNA expression in animal cells. *J Biochem (Tokio)*. mayo de 1987;101(5):1307-10.
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. noviembre de 1984;81(21):6851-5.
- 45 Naidu R, Yadav M, Nair S, Kutty MK. Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas. *Br J Cancer*. noviembre de 1998;78(10):1385-90.

- Neuberger MS, Williams GT, Fox RO. Recombinant antibodies possessing novel effector functions. *Nature*. 13-19 diciembre de 1984;312(5995):604-8.
- 5 O'Hare K, Benoist C, Breathnach R. Transformation of mouse fibroblasts to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*. marzo de 1981;78(3):1527-31.
- Padlan EA. A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol Immunol*. abril-mayo de 1991;28(4-5):489-98.
- 10 Plowman GD, Whitney GS, Neubauer MG, Green JM, McDonald VL, Todaro GJ, Shoyab M. Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. julio de 1990;87(13):4905-9.
- Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*. 24 de marzo de 1988;332(6162):323-7.
- 15 Roguska MA, Pedersen JT, Keddy CA, Henry AH, Searle SJ, Lambert JM, Goldmacher VS, Blattler WA, Rees AR, Guild BC. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 de febrero de 1994;91(3):969-73.
- Shitara K, Nakamura K, Tokutake-Tanaka Y, Fukushima M, Hanai N. A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells. *J Immunol Methods*. 3 de enero de 1994;167(1-2):271-8.
- Shopes B. A genetically engineered human IgG mutant with enhanced cytolytic activity. *J Immunol*. 1 de mayo de 1992;148(9):2918-22.
- 20 Studnicka GM, Soares S, Better M, Williams RE, Nadell R, Horwitz AH. Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. *Protein Eng*. junio de 1994;7(6):805-14.
- Thotakura NR, Bahl OP. Enzymatic deglycosylation of glycoproteins. *Methods Enzymol*. 1987;138:350-9.
- 25 Travis A, Pinder SE, Robertson JF, Bell JA, Wencyk P, Gullick WJ, Nicholson RI, Poller DN, Blamey RW, Elston CW, Ellis IO. C-erbB-3 in human breast carcinoma: expression and relation to prognosis and established prognostic indicators. *Br J Cancer*. julio de 1996;74(2):229-33.
- Urlaub G, Chasin LA. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. julio de 1980;77(7):4216-20.
- 30 van der Horst EH, Murgia M, Treder M, Ullrich A. Anti-HER-3 MAbs inhibit HER-3-mediated signaling in breast cancer cell lines resistant to anti-HER-2 antibodies. *Int J Cancer* 1 de julio de 2005;115(4):519-27.
- Xue C, Liang F, Mahmood R, Vuolo M, Wyckoff J, Qian H, Tsai KL, Kim M, Locker J, Zhang ZY, Segall JE. ErbB3-dependent motility and intravasation in breast cancer metastasis. *Cancer Res*. 1 de febrero de 2006;66(3):1418-26.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Millegen et al.
 <120> Anticuerpos contra HER3
 <130> Anticorps anti-HER3
 5 <160> 36
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 < 211> 5
 < 212> PRT
 10 < 213> Homo sapiens
 <400> 1
 Asp Tyr Ala Met His
 1 5
 <210> 2
 < 211> 16
 < 212> PRT
 15 < 213> Homo sapiens
 <400> 2
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 3
 < 211> 11
 < 212> PRT
 20 < 213> Homo sapiens
 <400> 3
 Glu Gly Gln Trp Pro Asn Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10
 25 <210> 4
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <400> 4
 Pro Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
 1 5 10
 30 <210> 5
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 35 <400> 5
 Asp Asn Asn Glu Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 6
 < 211> 11
 < 212> PRT
 40 < 213> Homo sapiens
 <400> 6
 Gly Ala Trp Asp Asn Thr Leu Gly Val Tyr Val
 1 5 10
 <210> 7
 < 211> 120

ES 2 657 862 T3

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 7

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 8

< 211> 110

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 8

10

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Pro Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Thr Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Asp Ile Thr Asp Leu Gln
65 70 75 80

Ala Glu Asp Glu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Ala Trp Asp Asn Thr Leu
85 90 95

Gly Val Tyr Val Leu Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 9

< 211> 360

ES 2 657 862 T3

	< 212> ADN	
	< 213> Homo sapiens	
	<400> 9	
	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcc a tgcaactgggt ccggcaagct	120
	ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttaga atagtggtag cataggetat	180
	gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaaggg	300
	cagtggccga actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca	360
5	<210> 10	
	< 211> 330	
	< 212> ADN	
	< 213> Homo sapiens	
	<400> 10	
	cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc cagggcagaa ggtcaccatc	60
	tcctgccctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc	120
	ccagggacag ccccccact cctcatttat gacaataatg agcgaccctc agggattcct	180
	gaccgattct ctggctccac gtctggcacg tcagccaccc tggacatcac cgacctccag	240
	gctgaggacg agggccacta ttattgcggt gcctgggata acaccctggg tgtttacgtc	300
10	ctcgggaactg ggacccagct caccgtttta	330
	<210> 11	
	< 211> 13	
	< 212> PRT	
	< 213> Homo sapiens	
15	<400> 11	
	Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asp Pro Val Asn	
	1 5 10	
	<210> 12	
	< 211> 7	
	< 212> PRT	
20	< 213> Homo sapiens	
	<400> 12	
	Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser	
	1 5	
	<210> 13	
	< 211> 11	
25	< 212> PRT	
	< 213> Homo sapiens	
	<400> 13	
	Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Arg Gly Tyr Val	
	1 5 10	
	<210> 14	
30	< 211> 120	
	< 212> PRT	
	< 213> Homo sapiens	

ES 2 657 862 T3

<400> 14

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 15

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asp
20 25 30

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

Ile Tyr Ser 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 Gln
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 Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

10

<210> 16

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 657 862 T3

<400> 16
 gaggtgcagc tgggtggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcc a tgcactgggt cgggcaagct 120
 ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag cataggttat 180
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaaggg 300
 cagtggccga actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

 <210> 17
 < 211> 330
 < 212> ADN
 < 213> Homo sapiens

 <400> 17
 cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtgatcctg taaactggta ccagcagctc 120
 ccagggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcgccctc aggggtccct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240
 tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgag gggttatgtc 300
 ttcggaactg ggaccaagct gaccgtccta 330

 <210> 18
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

 <400> 18
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Leu Asn
 1 5 10

 <210> 19
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

 <400> 19
 Ser Asn Asn Gln Arg Pro Pro
 1 5

 <210> 20
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

 <400> 20
 Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Lys Gly Tyr Val
 1 5 10

 <210> 21
 < 211> 120
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

 <400> 21
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

ES 2 657 862 T3

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
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 Ser Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Arg Ser Gly Ser Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

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

Lys Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 23
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

ES 2 657 862 T3

	<400> 23	
	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcc a tgcactgggt ccggcaagct	120
	ccaggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag cataggctat	180
	gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagga ctactgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaagg	300
	cagtggccga actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca	360
5	<210> 24 < 211> 330 < 212> ADN < 213> Homo sapiens	
	<400> 24	
	cagtctgtgt tgacgcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaattctt taaactggta ccagcagctc	120
	ccgggaacgg cccccaaact cctcatctac agtaataatc agcgcccccc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccag gtctggctcc tcggcctccc tggccatcag tgggctccag	240
	tctggggatg aggggtgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa gggttatgtc	300
	ttcggaactg ggaccagct caccgtttta	330
10	<210> 25 < 211> 13 < 212> PRT < 213> Homo sapiens	
	<400> 25	
	Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asp Thr Val Asn	
	1 5 10	
15	<210> 26 < 211> 11 < 212> PRT < 213> Homo sapiens	
	<400> 26	
	Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Tyr Val	
20	1 5 10	
	<210> 27 < 211> 110 < 212> PRT < 213> Homo sapiens	

ES 2 657 862 T3

<400> 27

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 Gly Asp
20 25 30

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

Ile Tyr Ser 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

Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 28

<211> 330

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 28

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga ggtgatactg taaactggta ccagcagctc	120
ccaggaacgg ccccaaaact cctcatctat agtaataatc agcggccctc aggggtccct	180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg	240
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggttatgtc	300
ttcggcactg ggaccaagct gaccgtccta	330

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Ser
1 5 10

<210> 30

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 657 862 T3

<400> 30

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 Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Gln Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

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

Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 31

<211> 330

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 31

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcttgttctg gaagcaggtc caacatcgga agtaatactg taagctggta ccagcaactc 120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcggccctc aggggtccct 180
gaccgattct ctggctccca gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tggactccag 240
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggttatgtc 300
ttcggaactg ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 32

<211> 624

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

ES 2 657 862 T3

Leu	Ser	Val	Thr	Gly	Asp	Ala	Glu	Asn	Gln	Tyr	Gln	Thr	Leu	Tyr	Lys
			20					25					30		
Leu	Tyr	Glu	Arg	Cys	Glu	Val	Val	Met	Gly	Asn	Leu	Glu	Ile	Val	Leu
		35					40					45			
Thr	Gly	His	Asn	Ala	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Trp	Ile	Arg	Glu	Val
	50					55					60				
Thr	Gly	Tyr	Val	Leu	Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Ser	Thr	Leu	Pro	Leu
65					70					75					80
Pro	Asn	Leu	Arg	Val	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Val	Tyr	Asp	Gly	Lys	Phe
				85					90					95	
Ala	Ile	Phe	Val	Met	Leu	Asn	Tyr	Asn	Thr	Asn	Ser	Ser	His	Ala	Leu
			100					105					110		
Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Thr	Gln	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Ser	Gly	Gly	Val
		115					120					125			
Tyr	Ile	Glu	Lys	Asn	Asp	Lys	Leu	Cys	His	Met	Asp	Thr	Ile	Asp	Trp
	130					135					140				
Arg	Asp	Ile	Val	Arg	Asp	Arg	Asp	Ala	Glu	Ile	Val	Val	Lys	Asp	Asn
145					150					155					160
Gly	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Cys	His	Glu	Val	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Trp
				165					170					175	
Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Thr	Leu	Thr	Lys	Thr	Ile	Cys	Ala
			180					185					190		
Pro	Gln	Cys	Asn	Gly	His	Cys	Phe	Gly	Pro	Asn	Pro	Asn	Gln	Cys	Cys
		195					200					205			
His	Asp	Glu	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ser	Gly	Pro	Gln	Asp	Thr	Asp	Cys
	210					215					220				
Phe	Ala	Cys	Arg	His	Phe	Asn	Asp	Ser	Gly	Ala	Cys	Val	Pro	Arg	Cys
225					230					235					240
Pro	Gln	Pro	Leu	Val	Tyr	Asn	Lys	Leu	Thr	Phe	Gln	Leu	Glu	Pro	Asn
				245					250					255	
Pro	His	Thr	Lys	Tyr	Gln	Tyr	Gly	Gly	Val	Cys	Val	Ala	Ser	Cys	Pro

ES 2 657 862 T3

260	265	270
His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala Cys Pro Pro 275 280 285		
Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys Glu Pro Cys 290 295 300		
Gly Gly Leu Cys Pro Lys Ala Cys Glu Gly Thr Gly Ser Gly Ser Arg 305 310 315 320		
Phe Gln Thr Val Asp Ser Ser Asn Ile Asp Gly Phe Val Asn Cys Thr 325 330 335		
Lys Ile Leu Gly Asn Leu Asp Phe Leu Ile Thr Gly Leu Asn Gly Asp 340 345 350		
Pro Trp His Lys Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Lys Leu Asn Val Phe 355 360 365		
Arg Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Asn Ile Gln Ser Trp Pro 370 375 380		
Pro His Met His Asn Phe Ser Val Phe Ser Asn Leu Thr Thr Ile Gly 385 390 395 400		
Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Arg Gly Phe Ser Leu Leu Ile Met Lys Asn 405 410 415		
Leu Asn Val Thr Ser Leu Gly Phe Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Ala 420 425 430		
Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Ala Asn Arg Gln Leu Cys Tyr His His Ser 435 440 445		
Leu Asn Trp Thr Lys Val Leu Arg Gly Pro Thr Glu Glu Arg Leu Asp 450 455 460		
Ile Lys His Asn Arg Pro Arg Arg Asp Cys Val Ala Glu Gly Lys Val 465 470 475 480		
Cys Asp Pro Leu Cys Ser Ser Gly Gly Cys Trp Gly Pro Gly Pro Gly 485 490 495		
Gln Cys Leu Ser Cys Arg Asn Tyr Ser Arg Gly Gly Val Cys Val Thr 500 505 510		

ES 2 657 862 T3

His Cys Asn Phe Leu Asn Gly Glu Pro Arg Glu Phe Ala His Glu Ala
515 520 525

Glu Cys Phe Ser Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Met Glu Gly Thr Ala
530 535 540

Thr Cys Asn Gly Ser Gly Ser Asp Thr Cys Ala Gln Cys Ala His Phe
545 550 555 560

Arg Asp Gly Pro His Cys Val Ser Ser Cys Pro His Gly Val Leu Gly
565 570 575

Ala Lys Gly Pro Ile Tyr Lys Tyr Pro Asp Val Gln Asn Glu Cys Arg
580 585 590

Pro Cys His Glu Asn Cys Thr Gln Gly Cys Lys Gly Pro Glu Leu Gln
595 600 605

Asp Cys Leu Gly Gln Thr Leu Val Leu Ile Gly Lys Thr His Leu Thr
610 615 620

<210> 33
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His
1 5 10 15

Phe Asn

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

<400> 34
Asp Phe Leu Ile Thr Gly Leu Asn Gly Asp Pro Trp His Lys Ile
1 5 10 15

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Leu Asp Phe Leu Ile Thr Gly Leu Asn Gly Asp Pro Trp His Lys Ile
1 5 10 15

Pro

<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Asp Pro Trp His Lys Ile
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-HER3 que comprende:
 - una cadena pesada en la que el dominio variable comprende el SEQ ID NO: 1 para H-CDR1, el SEQ ID NO: 2 para H-CDR2 y el SEQ ID NO: 3 para H-CDR3; y
- 5 - una cadena ligera en la que el dominio variable comprende el SEQ ID NO: 4 para L-CDR1, el SEQ ID NO: 5 para L-CDR2 y el SEQ ID NO: 6 para L-CDR3.
2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7.
3. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 8.
- 10 4. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en el SEQ ID NO: 7, y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 8.
- 15 5. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humano.
6. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.
7. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 8. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso como fármaco.
9. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento del cáncer.

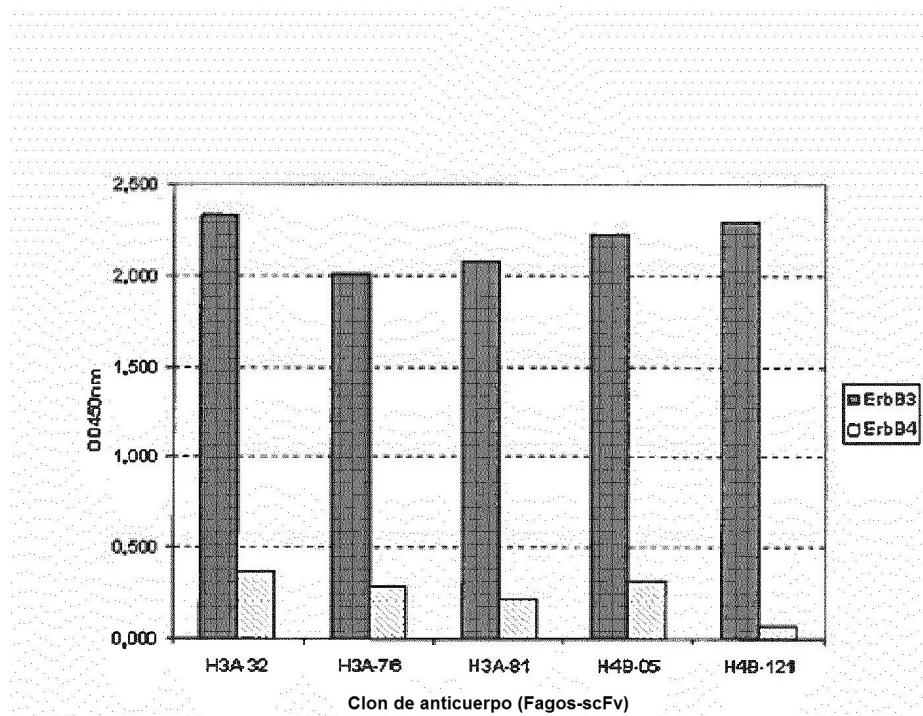


FIG. 1

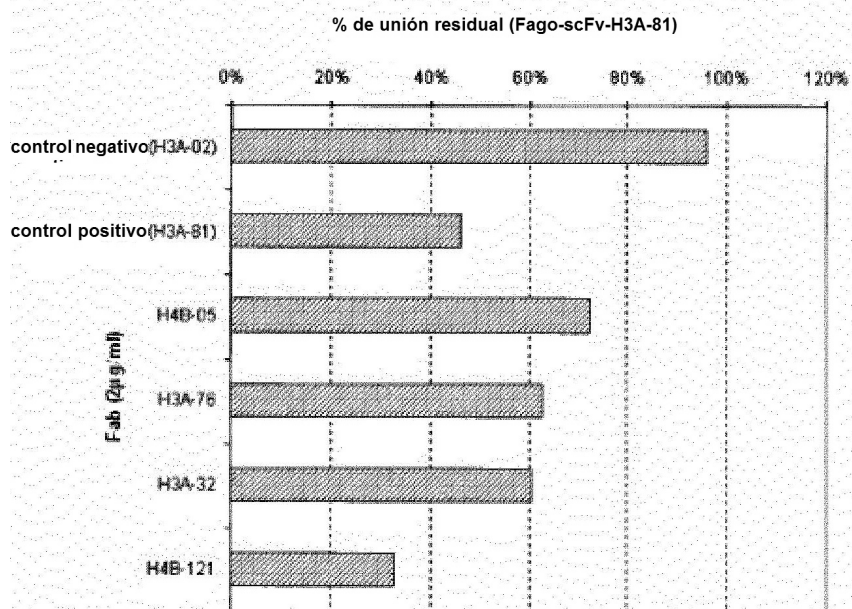


FIG. 2

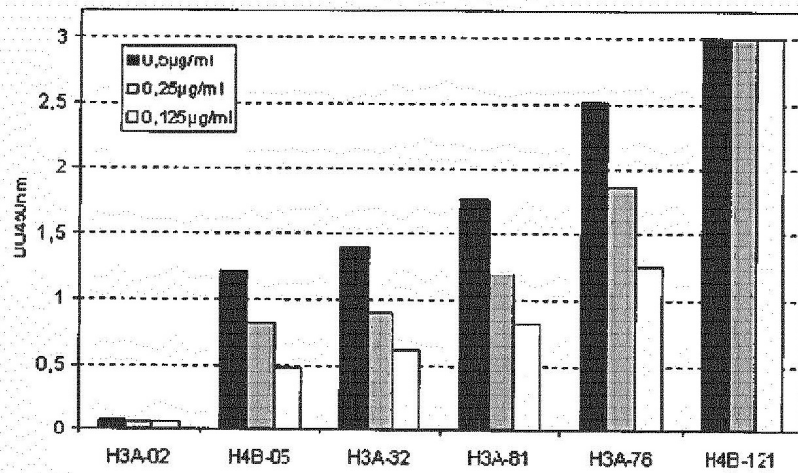


FIG. 3

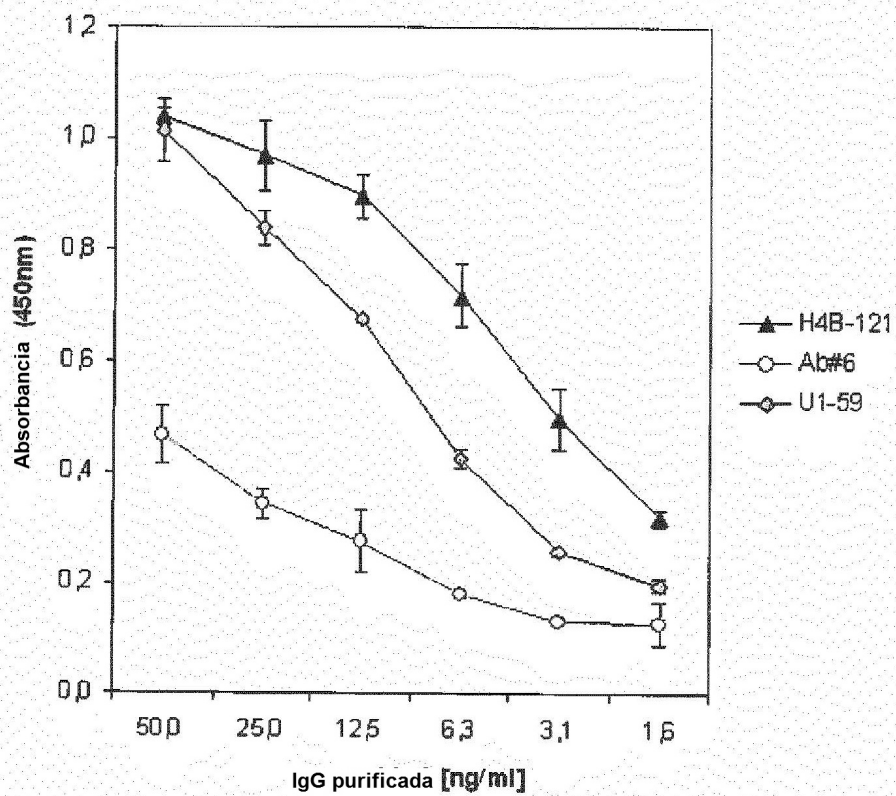


FIG. 4

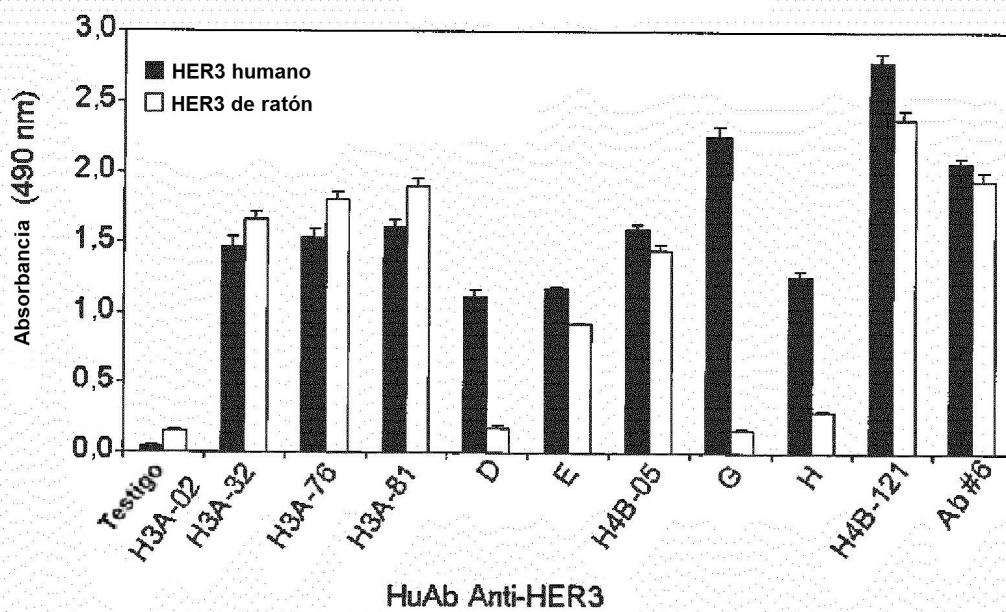


FIG. 5

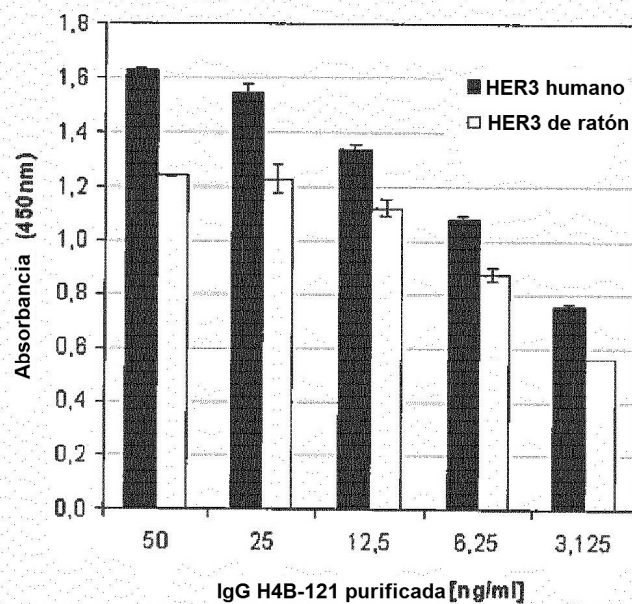


FIG. 6

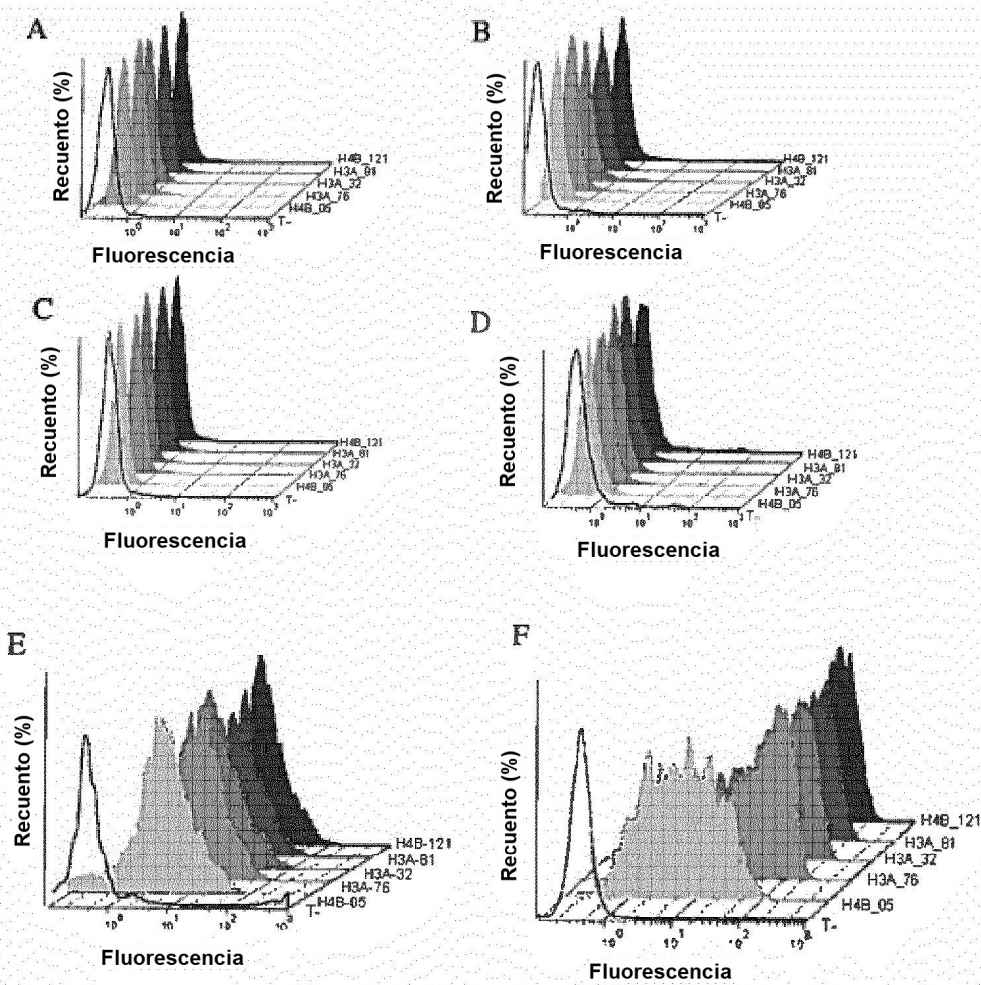


FIG. 7

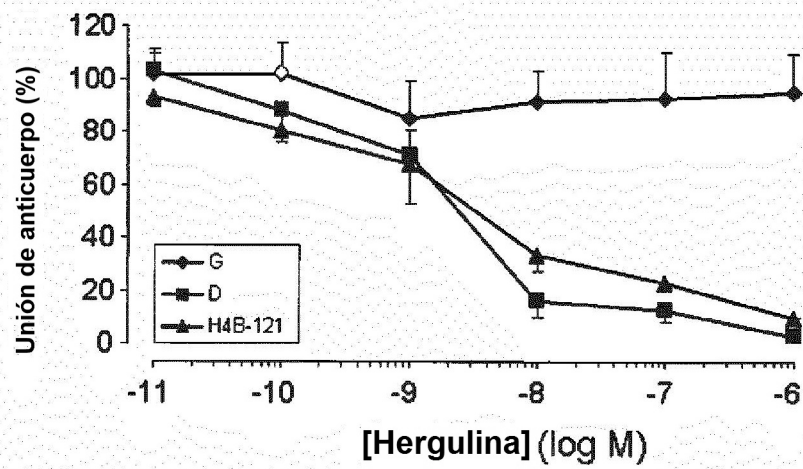


FIG. 8

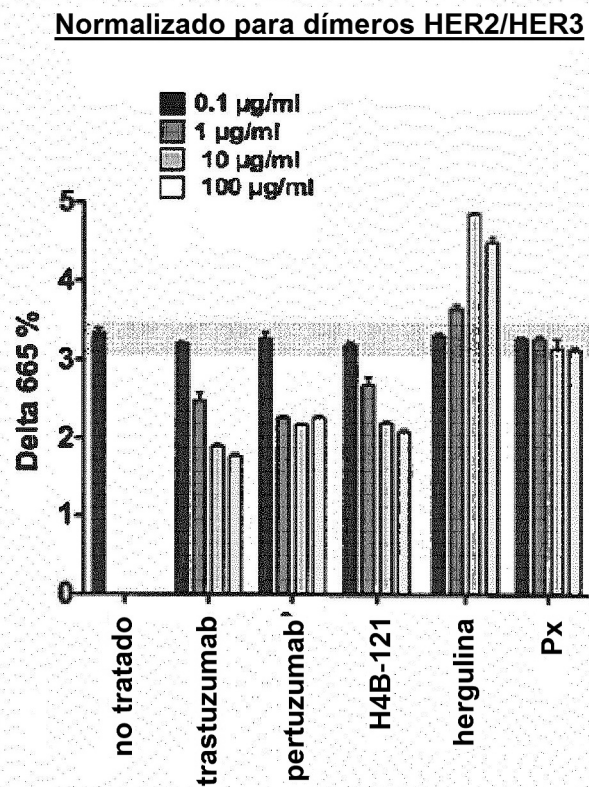


FIG. 9

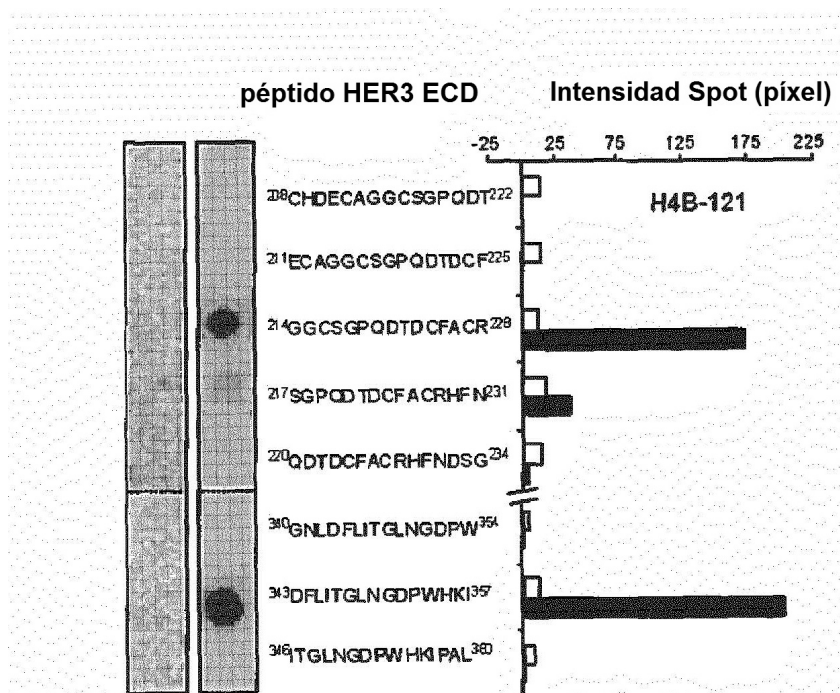
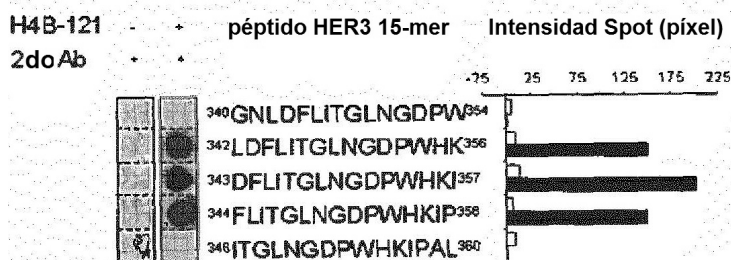


FIG. 10



Análisis Alscan

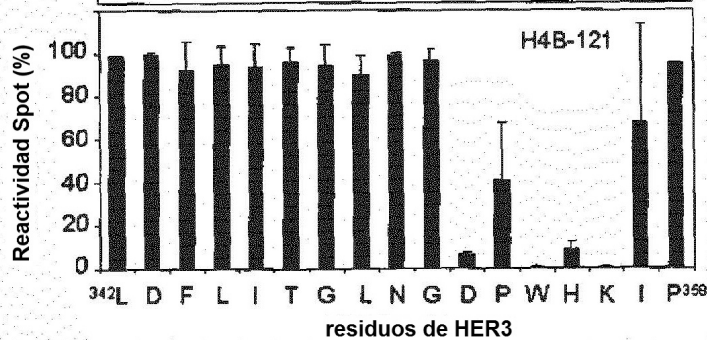
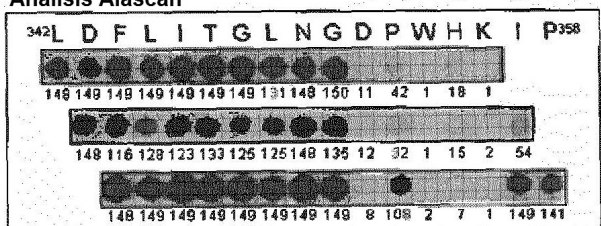


FIG. 11

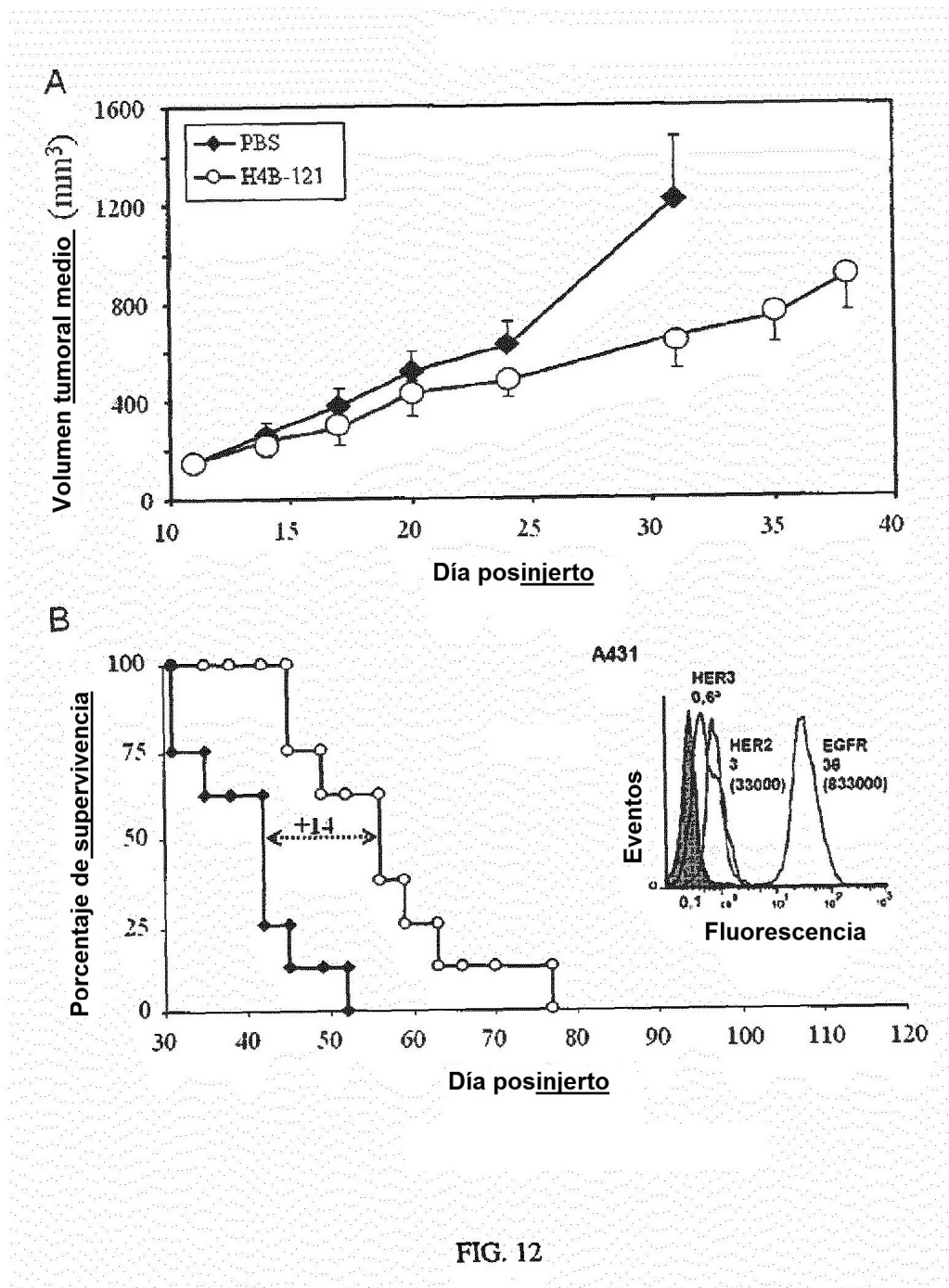


FIG. 12

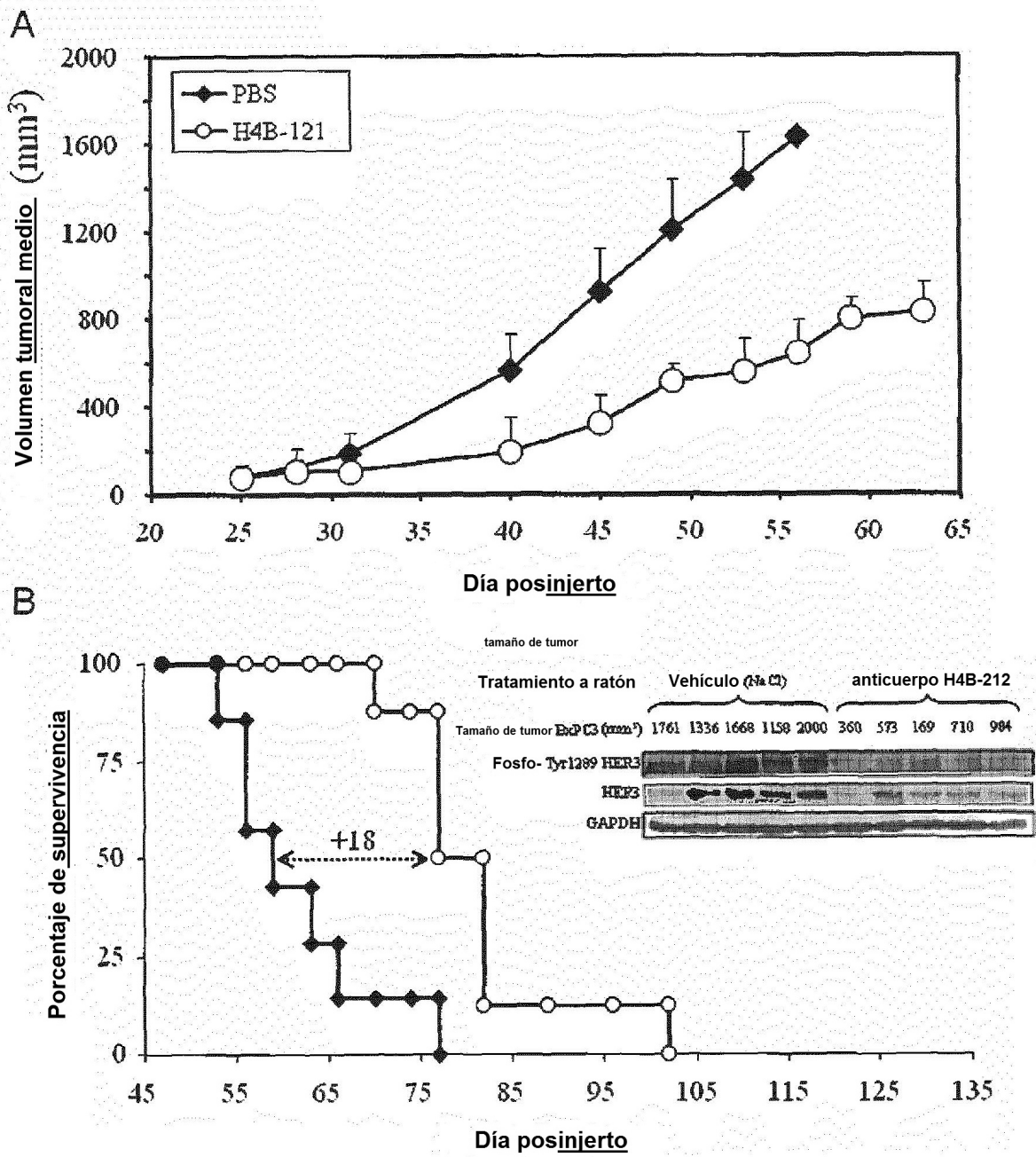


FIG. 13

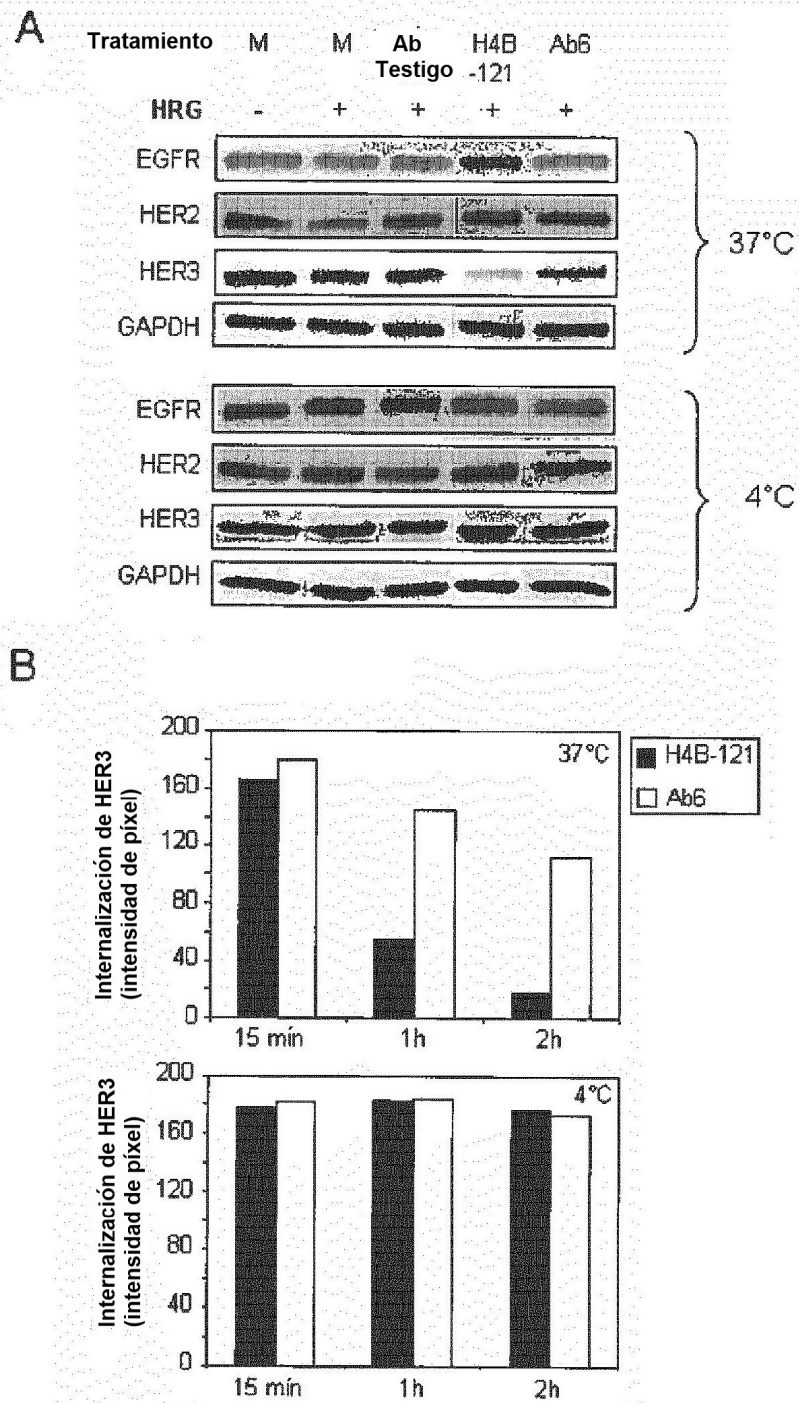


FIG. 14