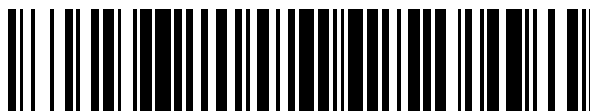


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 826 774**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61P 9/04	(2006.01) A61P 43/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01) A61P 35/04	(2006.01)
A61K 31/436	(2006.01)	
A61K 31/337	(2006.01)	
A61K 31/519	(2006.01)	
A61K 31/4439	(2006.01)	
A61K 31/4375	(2006.01)	
C07K 16/30	(2006.01)	
A61K 31/185	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2015** **E 18194847 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2020** **EP 3470435**

54 Título: **Anticuerpo que se une a ERBB-2 y ERBB-3**

30 Prioridad:

28.02.2014 EP 14157360
05.05.2014 EP 14167066

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.05.2021

73 Titular/es:

MERUS N.V. (100.0%)
Yalelaan 62
3584 CM Utrecht, NL

72 Inventor/es:

GEUIJEN, CECILIA ANNA WILHELMINA;
DE KRUIF, CORNELIS ADRIAAN;
THROSBY, MARK;
LOGTENBERG, TON y
BAKKER, ALEXANDER BERTHOLD HENDRIK

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 826 774 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo que se une a ERBB-2 y ERBB-3

La invención se refiere al campo de los anticuerpos. En particular, se refiere al campo de los anticuerpos terapéuticos (humanos) para el tratamiento de enfermedades que involucran células aberrantes. Más en particular, se refiere a anticuerpos que se unen a ErbB-2 y ErbB-3 y su uso en la unión de células positivas a ErbB-2 y ErbB-3, particularmente células tumorales.

La familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER, también denominada colectivamente red de señalización ErbB) es una familia de receptores de tirosina quinasas transmembrana (RTK). La familia incluye el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), también conocido como ErbB-1 (o HER1), y los receptores homólogos ErbB-2 (HER2), ErbB-3 (HER3) y ErbB-4 (HER4). Los receptores (revisados en Yarden and Pines 2012) se expresan ampliamente en células epiteliales. La sobreexpresión de los receptores HER o sus ligandos, como la heregulina (HRG) o el factor de crecimiento epidérmico (EGF), es un evento frecuente en el cáncer humano (Wilson, Fridlyand et al. 2012). La sobreexpresión de ErbB-1 y ErbB-2 en particular ocurre en tumores epiteliales y se asocia con invasión tumoral, metástasis, resistencia a la quimioterapia y mal pronóstico (Zhang, Berezov et al. 2007). En la mama normal, se ha demostrado que ErbB-3 es importante en el crecimiento y diferenciación del epitelio luminal. Por ejemplo, la pérdida/inhibición de ErbB-3 da como resultado una expansión selectiva del epitelio basal sobre el luminal (Balko, Miller et al. 2012). La unión del ligando al dominio extracelular de las RTK induce la dimerización del receptor, tanto entre el mismo (homodimerización) como entre diferentes subtipos de receptor (heterodimerización). La dimerización puede activar los dominios de tirosina quinasa intracelular, que se someten a autofosforilación y, a su vez, pueden activar una serie de vías de señalización proliferativas corriente abajo, incluidas las mediadas por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la ruta de prosupervivencia Akt (revisada en Yarden and Pines, 2012). No se ha identificado ningún ligando endógeno específico para ErbB-2, que por lo tanto se supone que normalmente señala mediante heterodimerización (Sergina, Rausch et al. 2007). ErbB-3 puede activarse mediante el acoplamiento de sus ligandos. Estos ligandos incluyen, pero no se limitan a, neuregulina (NRG) y heregulina (HRG).

Se han identificado diversos modos de activación de la señalización de la familia de receptores ErbB. Entre estos se encuentran la activación de la señalización dependiente e independiente del ligando. El ErbB-2 sobreexpresado es capaz de generar señalización oncogénica a través del heterodímero ErbB-2:ErbB-3 incluso en ausencia del ligando ErbB-3 (Junttila, Akita et al. 2009). La actividad de ErbB-2 puede inhibirse mediante anticuerpos específicos de ErbB-2. Dichos anticuerpos específicos de ErbB-2 se utilizan, por ejemplo, en el tratamiento de tumores positivos para ErbB-2 (HER2+). Un problema con tales tratamientos es que a menudo los tumores escapan al tratamiento específico de ErbB-2 y continúan creciendo incluso en presencia del anticuerpo inhibidor. Se ha observado que los tumores positivos para ErbB-2, como los tumores de mama, ováricos, cervicales y gástricos, pueden escapar al tratamiento debido al crecimiento selectivo de una subpoblación de células tumorales que exhiben expresión de ErbB-3 regulada al alza (Ocana, Vera-Badillo et al. 2013) y/o expresión del ligando ErbB-3 (Wilson, Fridlyand et al. 2012). También se han identificado mutaciones activadoras en el receptor ErbB-3.

El anticuerpo monoclonal anti-ErbB-2 trastuzumab (Herceptin) y el cetuximab específico de ErbB-1 (Erbix) se encuentran entre varios anticuerpos monoclonales aprobados para aplicación clínica. El trastuzumab tiene un beneficio de supervivencia comprobado en el cáncer de mama metastásico (Arteaga, Sliwkowski et al. 2011). El mecanismo de acción preciso de trastuzumab no se ha establecido de manera inequívoca. Los modos de acción sugeridos son la inhibición de la señalización de RTK y el reclutamiento de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Otros mecanismos de acción que se han descrito incluyen el bloqueo de la escisión proteolítica del dominio extracelular de ErbB-2, la inhibición de factores angiogénicos y la potenciación de la endocitosis del receptor. Otros agentes que interfieren con la señalización de ErbB-2 han sido aprobados o están en desarrollo para el tratamiento del cáncer de mama y otros cánceres de sobreexpresión de ErbB-2. Por ejemplo, el compuesto químico lapatinib inhibe la actividad tirosina quinasa ErbB-1 y ErbB-2 y se usa en el tratamiento de primera línea del cáncer de mama amplificado con ErbB-2.

En pacientes con cáncer de mama metastásico HER2+, la resistencia a trastuzumab, ya sea como agente único o en combinación con quimioterapia, se presenta comúnmente a los pocos meses de comenzar la terapia. Sólo una fracción de los pacientes con cáncer de mama metastásico HER2+ responde al trastuzumab como agente único, lo que sugiere mecanismos de novo de resistencia en cánceres avanzados. Estos mecanismos incluyen, entre otros, la señalización de otra familia de receptores HER y la señalización compensatoria de RTK fuera de la familia HER (Thery et al., Resistance to human epidermal growth factor receptor type 2-targeted therapies, Eur J Cancer (2014), Vol.50, Número 5, páginas 892-901 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2014.01.003>)). Por ejemplo, la sobreexpresión de HER3 o sus ligandos junto con HER2 conduce a la formación de heterodímeros HER-2/HER-3 y adquiere resistencia a trastuzumab. Por lo tanto, se cree que el anticuerpo trastuzumab es ineficaz para bloquear la señalización impulsada por ligandos ErbB-3 (Wehrman, Raab et al. 2006, Junttila, Akita et al. 2009, Thery et al. 2014).

Recientemente, el anticuerpo monoclonal pertuzumab fue aprobado para su uso en combinación con trastuzumab sobre la base de un beneficio adicional de supervivencia libre de progresión de 5 meses (Baselga, Cortes et al. 2012). Pertuzumab también se une a ErbB-2 pero en una posición diferente que trastuzumab.

Otras estrategias para tratar tumores positivos para ErbB-2 se dirigen hacia ErbB-3. Los anticuerpos monoclonales de unión a ErbB-3 han demostrado actividad en estudios preclínicos (Schoeberl, Faber et al. 2010). Algunos anticuerpos monoclonales que se unen a ErbB-3 pueden inhibir la proliferación y el crecimiento de una variedad de cánceres.

Otra estrategia implica la unión del receptor ErbB-2 y ErbB-3. La molécula MM-111 es una molécula biológica artificial que contiene dos fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) que se unen a ErbB-2 y ErbB-3. Los dos scFv están asociados con una proteína de albúmina de suero humano (HSA) mutada para aumentar la vida media de la molécula. En pruebas preclínicas, se demostró que la molécula inhibe la señalización y la proliferación de ErbB-3. Este efecto se midió predominantemente en líneas celulares positivas para ErbB-3 que expresaban cantidades relativamente altas de ErbB-2.

Robinson et al., British Journal of Cancer 99: 9, 1415-1425 (2008) describen un scFv inespecífico que se une a ErbB-2 y ErbB-3. Este scFv induce un nivel modesto de apoptosis de células ErbB-2 '+' / ErbB-3 '+' BT-474 y MDA-361/DYT2 in vitro. Se llegó a la conclusión de que este scFv provoca un efecto citostático en lugar de citotóxico sobre las células tumorales. La actividad antitumoral se debió casi en su totalidad a su brazo anti-ErbB-3. De acuerdo con la ausencia de una parte Fc, no se informó la actividad de ADCC. Kang et al., MAbs 6: 2, 340-353 (2014) describen anticuerpos biespecíficos contra ErbB-2 y ErbB-3 que se basan en Ab6 (anti ErbB-3) y trastuzumab o pertuzumab (anti ErbB-2). Estos anticuerpos se denominan Tab6 y Pab6. Cuando se usan solos, Tab6 y Pab6 no pueden inhibir la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama humano SK-BR-3, HCC1419 y BT-474. Tab6 solo exhibió actividad antiproliferativa contra estas células en combinación con el inhibidor de molécula pequeña lapatinib. Weidle et al., Cancer Genomics & Proteomics 10: 1-18 (2013) describen varios formatos de anticuerpos y usos de los mismos. La molécula MM-111 mencionada anteriormente contra ErbB-2 y ErbB-3 también se describe en el presente documento. La solicitud de patente internacional WO 2014/060365 a nombre de la Universität Zürich Prorektorat MNW describe un anticuerpo biespecífico contra ErbB-2 que comprende un primer ligando polipeptídico que se une al dominio extracelular I de ErbB-2 y un segundo ligando polipeptídico que se une al dominio extracelular IV de ErbB-2. ErbB-3 no está dirigido. Schaefer et al., Cancer Cell 20, 472-486 (2011) describen un anticuerpo IgG dos en uno contra ErbB-3 y ErbB-1 que se denomina MEHD7945A. ErbB-2 no está dirigido.

Resumen de la invención

La invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, y en donde el anticuerpo puede reducir una función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 en una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3. Preferiblemente, dicho primer sitio de unión a antígeno está presente en un dominio variable que comprende una cadena VH con la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (es MF2971 humanizado); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (es MF3004 humanizado); MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; MF3001; MF3003 o MF1898 como se muestra en la Figura 16A o la Figura 16E. Dicho segundo sitio de unión al antígeno está presente preferiblemente en un dominio variable que comprende una cadena VH con la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074 como se muestra en la Figura 16B o la Figura 16E o la Figura 37. La cadena liviana de inmunoglobulina en el dominio variable comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la Figura 16C.

Un anticuerpo de la invención es, a menos que se especifique específicamente lo contrario, preferiblemente un anticuerpo biespecífico.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Se proporciona además un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende además un marcador, preferiblemente un marcador para la formación de imágenes in vivo.

La invención también proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 o en riesgo de tener dicho tumor que comprende administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención. También se proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-3, en donde el anticuerpo biespecífico reduce o puede reducir una función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 en una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3.

Como se usa en el presente documento, el término "sitio de unión al antígeno" se refiere a un sitio derivado de un anticuerpo biespecífico que es capaz de unirse al antígeno y preferiblemente como está presente en él. Un sitio de unión al antígeno no modificado está formado típicamente por el dominio variable del anticuerpo y está presente en

él. El dominio variable contiene dicho sitio de unión al antígeno. Un dominio variable que se une a un antígeno es un dominio variable que comprende un sitio de unión al antígeno que se une al antígeno.

En una realización, un dominio variable de anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena liviana (VL). El sitio de unión al antígeno puede estar presente en el dominio variable combinado VH/VL, o solo en la región VH o solo en la región VL. Cuando el sitio de unión al antígeno está presente en solo una de las dos regiones del dominio variable, la región variable contraparte puede contribuir al plegamiento y/o la estabilidad de la región variable de unión, pero no contribuye significativamente a la unión del propio antígeno.

Como se usa en el presente documento, unión a antígeno se refiere a la capacidad de unión típica de un anticuerpo a su antígeno. Un anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2, se une a ErbB-2 y, en condiciones idénticas por lo demás, al menos 100 veces más bajo a los receptores homólogos ErbB-1 y ErbB-4 de la misma especie. Un anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, se une a ErbB-3 y, en condiciones idénticas por lo demás, no a los receptores homólogos ErbB-1 y ErbB-4 de la misma especie. Teniendo en cuenta que la familia ErbB es una familia de receptores de superficie celular, la unión se evalúa típicamente en las células que expresan el receptor o receptores. La unión de un anticuerpo a un antígeno se puede evaluar de diversas formas. Una forma es incubar el anticuerpo con el antígeno (preferiblemente células que expresan el antígeno), eliminando el anticuerpo no unido (preferiblemente mediante una etapa de lavado) y detectando el anticuerpo unido por medio de un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo unido.

La unión del antígeno por un anticuerpo típicamente está mediada a través de las regiones de complementariedad del anticuerpo y la estructura tridimensional específica tanto del antígeno como del dominio variable que permite que estas dos estructuras se unan con precisión (una interacción similar a un bloqueo y clave), en contraposición a la adhesión aleatoria e inespecífica de anticuerpos. Como un anticuerpo reconoce típicamente un epítipo de un antígeno, y como tal epítipo puede estar presente también en otros compuestos, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención que se unen a ErbB-2 y/o ErbB-3 también pueden reconocer otras proteínas, si tales otros compuestos contienen el mismo epítipo. Por tanto, el término "unión" no excluye la unión de los anticuerpos a otra proteína o proteínas que contienen el mismo epítipo. Preferiblemente, dicha(s) otra(s) proteína(s) no es una proteína humana. Un sitio de unión al antígeno ErbB-2 y un sitio de unión al antígeno ErbB-3 como se define en la presente invención normalmente no se unen a otras proteínas de la membrana de las células en un ser humano postnatal, preferiblemente adulto. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención es típicamente capaz de unirse a ErbB-2 y ErbB-3 con una afinidad de unión de al menos 1×10^{-6} M, como se describe con más detalle a continuación.

El término "interfiere con la unión" como se usa en el presente documento significa que el anticuerpo está dirigido a un epítipo en ErbB-3 y el anticuerpo compite con el ligando para unirse a ErbB-3. El anticuerpo puede disminuir la unión del ligando, desplazar el ligando cuando este ya está unido a ErbB-3 o puede, por ejemplo, a través de un impedimento estérico, evitar al menos parcialmente que el ligando pueda unirse a ErbB-3.

El término "anticuerpo", como se usa en este documento, significa una molécula proteínica, preferiblemente perteneciente a la clase de proteínas de inmunoglobulina, que contiene uno o más dominios variables que se unen a un epítipo en un antígeno, donde dichos dominios se derivan o comparten homología de secuencia con el dominio variable de un anticuerpo. Los anticuerpos para uso terapéutico son preferiblemente lo más cercanos posible a los anticuerpos naturales del sujeto a tratar (por ejemplo, anticuerpos humanos para sujetos humanos). La unión del anticuerpo se puede expresar en términos de especificidad y afinidad. La especificidad determina qué antígeno o epítipo del mismo se une específicamente al dominio de unión. La afinidad es una medida de la fuerza de unión a un antígeno o epítipo particular. La unión específica se define como la unión con afinidades (KD) de al menos 1×10^{-6} M, más preferiblemente 1×10^{-7} M, más preferiblemente superior a 1×10^{-9} M. Normalmente, los anticuerpos para aplicaciones terapéuticas tienen afinidades de hasta 1×10^{-10} M o superior. Los anticuerpos tales como los anticuerpos biespecíficos de la presente invención comprenden los dominios constantes (parte Fc) de un anticuerpo natural. Un anticuerpo de la invención es típicamente un anticuerpo biespecífico de longitud completa, preferiblemente de la subclase IgG humana. Preferiblemente, un anticuerpo de la presente invención es de la subclase IgG1 humana. Dichos anticuerpos de la invención tienen buenas propiedades ADCC, tienen una vida media favorable tras la administración in vivo a seres humanos y existe tecnología de ingeniería de CH3 que puede proporcionar cadenas pesadas modificadas que forman preferentemente heterodímeros sobre homodímeros tras la coexpresión en células clonales.

Un anticuerpo de la invención es preferiblemente un anticuerpo de "longitud completa". El término "longitud completa" de acuerdo con la invención se define como que comprende un anticuerpo esencialmente completo, que sin embargo no tiene necesariamente todas las funciones de un anticuerpo intacto. Para evitar dudas, un anticuerpo de longitud completa contiene dos cadenas pesadas y dos ligeras. Cada cadena contiene regiones constantes (C) y variables (V), que se pueden dividir en dominios designados CH1, CH2, CH3, VH y CL, VL. Un anticuerpo se une al antígeno a través de los dominios variables contenidos en la porción Fab y, después de la unión, puede interactuar con moléculas y células del sistema inmunológico a través de los dominios constantes, principalmente a través de la porción Fc. Los términos "dominio variable", "par VH/VL", "VH/VL" se utilizan aquí indistintamente. Los anticuerpos de longitud completa de acuerdo con la invención abarcan anticuerpos en los que pueden estar presentes mutaciones que proporcionan las características deseadas. Tales mutaciones no deberían ser eliminaciones de porciones sustanciales

de ninguna de las regiones. Sin embargo, los anticuerpos en los que se eliminan uno o varios residuos de aminoácidos, sin alterar esencialmente las características de unión del anticuerpo resultante, se incluyen en el término "anticuerpo de longitud completa". Por ejemplo, un anticuerpo IgG puede tener inserciones de residuos de aminoácidos de 1 a 20, eliminaciones o una combinación de los mismos en la región constante. Por ejemplo, la actividad ADCC de un anticuerpo se puede mejorar cuando el propio anticuerpo tiene una baja actividad ADCC, modificando ligeramente la región constante del anticuerpo (Junttila, T.T, K. Parsons, et al. (2010). "Superior In vivo Efficacy of Afucosylated Trastuzumab in the Treatment of HER2-Amplified Breast Cancer." Cancer Research 70 (11): 4481-4489).

Se prefieren los anticuerpos IgG de longitud completa debido a su vida media favorable y la necesidad de permanecer lo más cerca posible de moléculas completamente autólogas (humanas) por razones de inmunogenicidad. Un anticuerpo de la invención es preferiblemente un anticuerpo IgG biespecífico, preferiblemente un anticuerpo IgG1 biespecífico de longitud completa. La IgG1 se ve favorecida por su larga vida media circulatoria en el hombre. Para prevenir cualquier inmunogenicidad en humanos, se prefiere que el anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención sea una IgG1 humana.

El término "biespecífico" (bs) significa que una parte del anticuerpo (como se definió anteriormente) se une a un epítipo en un antígeno mientras que una segunda parte se une a un epítipo diferente. El epítipo diferente está típicamente presente en un antígeno diferente. Según la presente invención, dicho primer y segundo antígenos son de hecho dos proteínas diferentes. Un anticuerpo biespecífico preferido es un anticuerpo que comprende partes de dos anticuerpos monoclonales diferentes y, en consecuencia, se une a dos tipos diferentes de antígeno. Un brazo del anticuerpo biespecífico contiene típicamente el dominio variable de un anticuerpo y el otro brazo contiene el dominio variable de otro anticuerpo. Las regiones variables de cadena pesada del anticuerpo biespecífico de la invención son típicamente diferentes entre sí, mientras que las regiones variables de cadena liviana son preferiblemente las mismas en los anticuerpos biespecíficos de la invención. Un anticuerpo biespecífico en donde las diferentes regiones variables de la cadena pesada están asociadas con la misma cadena liviana o común, también se denomina anticuerpo biespecífico con una cadena liviana común. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, en donde ambos brazos comprenden una cadena liviana común.

Los anticuerpos biespecíficos preferidos se pueden obtener mediante la coexpresión de dos cadenas pesadas diferentes y una cadena liviana común en una única célula. Cuando se utilizan dominios CH3 de tipo salvaje, la coexpresión de dos cadenas pesadas diferentes y una cadena liviana común dará como resultado tres especies diferentes, AA, AB y BB. Para aumentar el porcentaje del producto biespecífico deseado (AB) se puede emplear la ingeniería de CH3, o, en otras palabras, se pueden usar cadenas pesadas con dominios de heterodimerización compatibles, como se define a continuación.

El término 'dominios de heterodimerización compatibles' como se usa en este documento se refiere a dominios de proteínas que se diseñan de tal manera que el dominio A' formado preferentemente heterodímeros con el dominio B' diseñado y viceversa, mientras que la homodimerización entre A'-A' y B'-B' está disminuido.

El término "cadena liviana común" de acuerdo con la invención se refiere a cadenas livianas que pueden ser idénticas o tener algunas diferencias en la secuencia de aminoácidos, mientras que la especificidad de unión del anticuerpo de longitud completa no se ve afectada. Por ejemplo, es posible dentro del alcance de la definición de cadenas livianas comunes como se usa en este documento, preparar o encontrar cadenas livianas que no sean idénticas, pero aún funcionalmente equivalentes, por ejemplo, mediante la introducción y prueba de cambios conservadores de aminoácidos, cambios de aminoácidos en regiones que no contribuyen o contribuyen sólo parcialmente a la especificidad de unión cuando se emparejan con la cadena pesada, y similares. Los términos "cadena liviana común", "VL común", "cadena liviana simple", "VL simple", con o sin la adición del término "reordenado", se usan todos de manera intercambiable. Es un aspecto de la presente invención usar como cadena liviana común una cadena liviana humana que puede combinarse con diferentes cadenas pesadas para formar anticuerpos con dominios de unión a antígenos funcionales (WO2004/009618, WO2009/157771, Merchant et al.1998 and Nissim et al. al.1994). Preferiblemente, la cadena liviana común tiene una secuencia de línea germinal. Una secuencia de línea germinal preferida es una región variable de cadena liviana que se usa con frecuencia en el repertorio humano y tiene buena estabilidad termodinámica, rendimiento y solubilidad. Una cadena liviana de la línea germinal preferida es 012, preferiblemente la cadena liviana kappa humana de la línea germinal reordenada IgVk1-39*01/IGJk1*01 o un fragmento o un equivalente funcional (es decir, el mismo segmento del gen IgVk1-39 pero diferente segmento del gen IGJk) del mismo (nomenclatura según a la base de datos IMGT en la web mundial en imgt.org). Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, en donde dicha cadena liviana común es una cadena liviana de la línea germinal, preferiblemente una cadena liviana kappa humana de la línea germinal reordenada que comprende el segmento del gen IgVKI-39, más preferiblemente la cadena liviana kappa humana de la línea germinal reordenada IgVk1-39*01/IGJk1*01. Los términos IgVk1-39* 01/IGJk1*01 de cadena liviana kappa humana de línea germinal reordenada, IGKV1-39/IGKJ1, cadena liviana huVk1-39 o, en resumen, huVk1-39 se usan indistintamente en toda la solicitud. Obviamente, los expertos en la técnica reconocerán que "común" también se refiere a equivalentes funcionales de la cadena liviana cuya secuencia de aminoácidos no es idéntica. Existen muchas variantes de dicha cadena liviana en las que están presentes mutaciones (eliminaciones, sustituciones, adiciones) que no influyen materialmente en la formación de regiones de unión funcionales. La cadena liviana de la presente invención también puede ser una cadena liviana como se especifica aquí anteriormente, que tiene inserciones, eliminaciones, sustituciones de 1-5 aminoácidos o una combinación de las mismas.

También se contemplan anticuerpos en los que un VH es capaz de reconocer específicamente un primer antígeno y el VL, emparejado con el VH en un dominio variable de inmunoglobulina, es capaz de reconocer específicamente un segundo antígeno. El par VH/VL resultante se unirá al antígeno 1 o al antígeno 2. Los denominados "anticuerpos dos en uno", descritos, por ejemplo, en los documentos WO 2008/027236, WO 2010/108127 y Schaefer et al (Cancer Cell 20, 472-486, octubre de 2011), son diferentes de los anticuerpos biespecíficos de la invención y se denominan además anticuerpos "dos en uno". Dichos anticuerpos "dos en uno" tienen brazos idénticos y no son anticuerpos de la presente invención.

El término 'ErbB-2' como se usa en este documento se refiere a la proteína que en humanos está codificada por el gen ERBB-2. Los nombres alternativos para el gen o la proteína incluyen CD340; HER-2; HER-2/neu; MLN 19; NEU; NGL; TKR1. El gen ERBB-2 se denomina frecuentemente HER2 (del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano). Cuando se hace aquí referencia a ErbB-2, la referencia se refiere a ErbB-2 humano. Un anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2, se une a ErbB-2 humano. El sitio de unión al antígeno ErbB-2 puede, debido a la similitud de secuencia y estructura terciaria entre ortólogos humanos y de otros mamíferos, también unirse a dicho ortólogo, pero no necesariamente. Los números de acceso a la base de datos para la proteína ErbB-2 humana y el gen que la codifica son (NP_001005862.1, NP_004439.2 NC_000017.10 NT_010783.15 NC_018928.2). Los números de acceso se dan principalmente para proporcionar un método adicional de identificación de ErbB-2 como diana, la secuencia real de la proteína ErbB-2 unida al anticuerpo puede variar, por ejemplo, debido a una mutación en el gen codificante, como las que ocurren en algunos cánceres o similares. El sitio de unión del antígeno ErbB-2 se une a ErbB-2 y una variedad de variantes del mismo, como las expresadas por algunas células tumorales positivas para ErbB-2.

El término "ErbB-3", como se usa en este documento, se refiere a la proteína que en humanos está codificada por el gen ERBB-3. Los nombres alternativos para el gen o la proteína son HER3; LCCS2; MDA-BF-1; c-ErbB-3; c-erbb-3; erbb-3-S; p180-ErbB-3; p45-sErbB-3; y p85-sErbB-3. Cuando se hace aquí referencia a ErbB-3, la referencia se refiere a ErbB-3 humano. Un anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, se une a ErbB-3 humano. El sitio de unión al antígeno ErbB-3, debido a la similitud de secuencia y estructura terciaria entre ortólogos humanos y de otros mamíferos, también puede unirse a dicho ortólogo, pero no necesariamente. Los números de acceso a la base de datos para la proteína ErbB-3 humana y el gen que la codifica son (NP_001005915.1 NP_001973.2, NC_000012.11 NC_018923.2 NT_029419.12). Los números de acceso se dan principalmente para proporcionar un método adicional de identificación de ErbB-3 como diana, la secuencia real de la proteína ErbB-3 unida por un anticuerpo puede variar, por ejemplo, debido a una mutación en el gen codificante como los que ocurren en algunos cánceres o similares. El sitio de unión al antígeno ErbB-3 se une a ErbB-3 y una variedad de variantes de la misma, como las expresadas por algunas células tumorales positivas para ErbB-2.

Un anticuerpo biespecífico de la invención que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, puede reducir o reduce una función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 en una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3. En presencia de un exceso de ErbB-2, los heterodímeros ErbB-2/ErbB-3 pueden proporcionar una señal de crecimiento a la célula de expresión en ausencia de un ligando detectable para la cadena ErbB-3 en el heterodímero. Esta función del receptor ErbB-3 se denomina en el presente documento una función receptora independiente del ligando de ErbB-3. El heterodímero ErbB-2/ErbB-3 también proporciona una señal de crecimiento a la célula de expresión en presencia de un ligando ErbB-3. Esta función del receptor ErbB-3 se denomina en el presente documento una función del receptor inducida por ligando de ErbB-3.

El término "ligando de ErbB-3", como se usa aquí, se refiere a polipéptidos que se unen a y activan ErbB-3. Ejemplos de ligandos ErbB-3 incluyen, pero no se limitan a, neuregulina 1 (NRG) y neuregulina 2, betacelulina, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina y epirregulina. El término incluye fragmentos y/o variantes biológicamente activos de un polipéptido de origen natural.

En una realización preferida de la invención, la función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 es el crecimiento inducido por ligando de ErbB-3 de una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3. En una realización preferida, dicha célula es una célula MCF-7 (ATCC® HTB-22™); una célula SKBR3 (ATCC® HTB-30™); una célula NCI-87 (ATCC® CRL-5822™); una célula BxPC-3-luc2 (Perkin Elmer 125058), una célula BT-474 (ATCC® HTB-20™) o una célula JIMT-1 (DSMZ No.: ACC 589).

En una realización preferida, la célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3 comprende al menos 50.000 receptores ErbB-2 en la superficie celular. En una realización preferida, al menos 100.000 receptores ErbB-2. En una realización preferida, la célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3 comprende al menos 1.000.000 de receptores ErbB-2 en la superficie celular. En otra realización preferida, la célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3 comprende no más de 1.000.000 de receptores ErbB-2 en la superficie celular. Las terapias actualmente utilizadas como trastuzumab (Herceptin) y pertuzumab solo se prescriben a pacientes con células malignas positivas para ErbB-2 que tienen más de 1.000.000 de receptores ErbB-2 en su superficie celular, con el fin de obtener una respuesta clínica. Los pacientes con células tumorales positivas para ErbB-2 con más de 1.000.000 de receptores ErbB-2 en su superficie celular se clasifican típicamente como ErbB-2 [+++]. Los pacientes se clasifican, por ejemplo, utilizando HercepTest™ y/o HER2 FISH (pharm Dx™), comercializados por Dako Denmark A/S, y/o usando un ensayo HERmark®, comercializado por Monogram Biosciences. Trastuzumab y pertuzumab solo se recetan a pacientes con ErbB-2 [+++] porque los pacientes con concentraciones más bajas de ErbB-2 generalmente no muestran una respuesta clínica suficiente cuando se

tratan con trastuzumab y pertuzumab. Sin embargo, la invención proporciona anticuerpos biespecíficos que también tienen una afinidad de unión mejorada por células con una concentración de receptor ErbB-2 más baja, en comparación con trastuzumab. Como se muestra en los Ejemplos, la proliferación de tales células con menor expresión de ErbB2 se contrarresta eficazmente con un anticuerpo de acuerdo con la invención. Esta concentración más baja del receptor ErbB-2 está presente en células malignas de pacientes que se clasifican como ErbB-2 [++] o ErbB-2 [+]. Además, los tumores positivos para ErbB-2 recidivos a menudo tienen una concentración de receptor ErbB-2 inferior a 1.000.000 de receptores por célula. Por tanto, dichos pacientes con ErbB-2 [++] o ErbB-2 [+], así como los pacientes con un tumor positivo para ErbB-2 recidivo, se tratan preferiblemente con un anticuerpo biespecífico según la presente invención. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde el anticuerpo puede reducir el crecimiento inducido por ligando de ErbB-2 y ErbB-3. célula positiva que tiene menos de 1.000.000 de receptores de superficie celular ErbB-2. También se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 o en riesgo de tener dicho tumor, en donde dicho tumor tiene menos de 1.000.000 de ErbB-2 receptores de superficie celular por célula, comprendiendo el método administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, en donde dicho tumor tiene menos de 1.000.000 de ErbB. También se proporcionan aquí los receptores ErbB-2 de la superficie celular por célula. Dicho anticuerpo de acuerdo con la presente invención es típicamente capaz de reducir una función de receptor inducida por ligando, preferiblemente crecimiento inducido por ligando, de ErbB-3 en una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3. Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferiblemente un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une al dominio III de ErbB-3. En una realización preferida, la afinidad de dicho segundo sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-3 positiva es igual o superior a la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-2 positiva, como se explica a continuación en el presente documento, con más detalle. La afinidad de dicho segundo sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-3 positiva es preferiblemente menor o igual a 2.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.39 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.99 nM. La afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula positiva para ErbB-2 es preferiblemente menor o igual a 5.0 nM, preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, preferiblemente menor o igual a 4.0 nM.

En una realización preferida, dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende un sitio de unión al antígeno que se une al menos a un aminoácido del dominio I de ErbB-2 seleccionado del grupo que consiste en T144, T164, R166, P172, G179, S180 y R181, y residuos de aminoácidos expuestos en la superficie que se encuentran dentro de aproximadamente 5 posiciones de aminoácidos de T144, T164, R166, P172, G179, S180 o R181.

En una realización preferida, dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferiblemente un sitio de unión al antígeno que se une al menos a un aminoácido del dominio III de ErbB-3 seleccionado del grupo que consiste en R426 y residuos de aminoácidos expuestos a la superficie que se encuentran dentro 11.2 Å de R426 en la proteína ErbB-3 nativa.

Para establecer si un tumor es positivo para ErbB-3, el experto en la materia puede, por ejemplo, determinar la amplificación y/o tinción de ErbB-3 en inmunohistoquímica. Al menos el 10% de las células tumorales en un *biopt* deben ser positivas. El *biopt* también puede contener 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o más células positivas.

Como se usa en este documento, la función del receptor inducida por ligando se reduce en al menos 20%, preferiblemente al menos 30, 40, 50, 60 o al menos 70% en una realización particularmente preferida, la función del receptor inducida por ligando se reduce en 80%, más preferiblemente en un 90%. La reducción se determina preferiblemente determinando una función del receptor inducida por ligando en presencia de un anticuerpo biespecífico de la invención, y comparándola con la misma función en ausencia del anticuerpo, en condiciones por lo demás idénticas. Las condiciones comprenden al menos la presencia de un ligando ErbB-3. La cantidad de ligando presente es preferiblemente una cantidad que induce la mitad del crecimiento máximo de una línea celular positiva para ErbB-2 y ErbB-3. La línea celular positiva para ErbB-2 y ErbB-3 para esta prueba es preferiblemente la línea celular MCF-7 (ATCC® HTB-22™), las células de la línea celular SKBR3 (ATCC® HTB-30™), las células JIMT-1 línea (DSMZ ACC 589) o la línea celular NCI-87 (ATCC® CRL-5822™). La prueba y/o el ligando para determinar la función del receptor inducida por ligando ErbB-3 es preferiblemente una prueba para la reducción del crecimiento inducida por ligando ErbB-3 como se especifica en los ejemplos.

La proteína ErbB-2 contiene varios dominios (véase como referencia la Figura 1 de Landgraf, R Breast Cancer Res. 2007; 9(1): 202-). Los dominios extracelulares se denominan dominios I-IV. Se ha mapeado el lugar de unión a los dominios respectivos de los sitios de unión a antígeno de los anticuerpos descritos en este documento (véanse los ejemplos). Un anticuerpo biespecífico de la invención con un sitio de unión al antígeno (primer sitio de unión al antígeno) que se une al dominio I o al dominio IV de ErbB-2 (primer sitio de unión al antígeno) comprende una región variable de cadena pesada que mantiene una especificidad y afinidad de unión significativas para ErbB-2 cuando se combina con varias cadenas livianas. Anticuerpos biespecíficos con un sitio de unión al antígeno (primer sitio de unión al antígeno) que se une al dominio I o al dominio IV de ErbB-2 (primer sitio de unión al antígeno) y un sitio de unión al antígeno para ErbB-3 (segundo sitio de unión al antígeno) resultaron ser más eficaces para reducir la función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 en comparación con un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de

unión al antígeno (primer sitio de unión al antígeno) que se une a otro dominio extracelular de ErbB-2. Se prefiere un anticuerpo biespecífico que comprende un sitio de unión al antígeno (primer sitio de unión al antígeno) que se une a ErbB-2, en donde dicho sitio de unión al antígeno se une al dominio I o al dominio IV de ErbB-2. Preferiblemente, dicho sitio de unión al antígeno se une al dominio IV de ErbB-2. Se encontró que un anticuerpo biespecífico con un sitio de unión al antígeno (primer sitio de unión al antígeno) que se une a ErbB-2, y que además comprende ADCC, es más efectivo que otros anticuerpos de unión a ErbB-2 que no tenían una actividad significativa de ADCC, particularmente en vivo. Por tanto, se prefiere un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que presente ADCC. Se encontró que los anticuerpos en los que dicho primer sitio de unión al antígeno se une al dominio IV de ErbB-2 tenían actividad ADCC intrínseca. Un anticuerpo de unión a ErbB-2 que se une al dominio I que tiene una baja actividad intrínseca de ADCC se puede diseñar para mejorar la actividad de ADCC. Algunos de estos receptores, como CD16A (FcγRIIA) y CD32A (FcγRIIA), activan las células para generar una respuesta contra los antígenos. Otros receptores, como el CD32B, inhiben la activación de las células inmunes. Mediante la ingeniería de regiones Fc (mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos) que se unen a los receptores de activación con mayor selectividad, se pueden crear anticuerpos que tengan una mayor capacidad para mediar las actividades citotóxicas deseadas por un Mab anticanceroso.

Una técnica para mejorar la ADCC de un anticuerpo es la afucosilación. (Véase, por ejemplo, Junttila, T. T., K. Parsons, et al. (2010). "Superior in vivo Efficacy of Afucosylated Trastuzumab in the Treatment of HER2-Amplified Breast Cancer". *Cancer Research* 70 (11): 4481-4489). Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, que está afucosilado. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden usar muchas otras estrategias para lograr la mejora de ADCC, por ejemplo, incluida la glicoingeniería (Kyowa Hakko/Biowa, GlycArt (Roche) and Eureka Therapeutics) y la mutagénesis (Xencor and MacroGenics), todas las cuales buscan mejorar la unión de Fc para activar FcγRIIIa de baja afinidad, y/o para reducir la unión al FcγRIIb inhibidor de baja afinidad.

Existen varios métodos in vitro para determinar la eficacia de anticuerpos o células efectoras para provocar ADCC. Entre estos se encuentran los ensayos de liberación de cromo-51 [Cr51], los ensayos de liberación de europio [Eu] y los ensayos de liberación de azufre-35 [S35]. Por lo general, una línea de células diana marcada que expresa un cierto antígeno expuesto en la superficie se incubaba con un anticuerpo específico para ese antígeno. Después del lavado, las células efectoras que expresan el receptor de Fc CD16 se incuban habitualmente conjuntamente con las células diana marcadas con anticuerpo. Posteriormente, la lisis de las células diana se mide típicamente mediante la liberación del marcador intracelular, por ejemplo, mediante un contador de centelleo o espectrofotometría. Una prueba preferida se detalla en los Ejemplos.

Una ventaja de la presente invención es el hecho de que la unión de anticuerpos de acuerdo con la invención tales como, por ejemplo, PB4188 a células ErbB-2 y ErbB-3 positivas da como resultado una internalización que es en el mismo grado en comparación con trastuzumab. Si se usa una combinación de trastuzumab y pertuzumab, se potencia la internalización de estos anticuerpos. Esta internalización mejorada, sin embargo, da como resultado una ADCC reducida. Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención que da como resultado una internalización que es esencialmente en el mismo grado que el trastuzumab es, por lo tanto, preferido sobre una combinación de trastuzumab y pertuzumab porque con tal anticuerpo la actividad ADCC se mantiene mejor.

Un anticuerpo de la invención que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, interfiere con la unión de un ligando de ErbB-3 a ErbB-3. Dichos anticuerpos son más efectivos para reducir la función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 en una línea celular positiva para ErbB-2 y ErbB-3, particularmente en el contexto de un anticuerpo biespecífico que también comprende un sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-2.

Las realizaciones preferidas de la presente invención proporcionan un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde dicho primer sitio de unión a antígeno se une al dominio I de ErbB-2. Como se muestra en los Ejemplos, los anticuerpos biespecíficos que tienen estas características son muy capaces de unirse a células positivas para ErbB-2 y ErbB-3 y contrarrestar su actividad (como la función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 y el crecimiento inducido por ligando de células positivas para ErbB-2 y ErbB-3). Además, los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención que comprenden un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 son particularmente adecuados para su uso en combinación con terapias anti-ErbB-2 existentes como trastuzumab y pertuzumab, porque trastuzumab y pertuzumab se unen a dominios diferentes de ErbB-2. Trastuzumab se une al dominio IV de ErbB-2 y pertuzumab se une al dominio II de ErbB-2. Por tanto, se prefieren los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención que se unen al dominio I de ErbB-2 porque no compiten con trastuzumab y pertuzumab por el mismo epítipo.

Otra realización preferida proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde dicho segundo sitio de unión a antígeno se une al dominio III de ErbB-3. Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para la terapia de combinación con moléculas de unión anti-ErbB-3 actualmente utilizadas que no se unen al dominio III de ErbB-3, como MM-121 (Merrimack Pharmaceuticals; también denominado #Ab6) y RG7116 (Roche) que se unen al dominio I de ErbB-3, porque entonces las diferentes moléculas de unión no compiten entre sí por el mismo epítipo.

Preferiblemente, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde dicho primer sitio de unión a antígeno se une al dominio I de ErbB-2, y dicho segundo sitio de unión al antígeno se une al dominio III de ErbB-3. Dicho anticuerpo es particularmente adecuado para la terapia de combinación con moléculas de unión anti-ErbB-2 que no se unen al dominio I de ErbB-2, como trastuzumab y pertuzumab, y con moléculas de unión anti-ErbB-3 que no se unen al dominio III de ErbB-3, como MM-121 (#Ab6) y RG7116.

Una realización preferida proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde dicho primer sitio de unión a antígeno se une al dominio I de ErbB-2, y dicho segundo sitio de unión al antígeno se une al dominio III de ErbB-3 y en donde el anticuerpo puede reducir una función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 en una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3. Dicho anticuerpo puede reducir preferiblemente el crecimiento inducido por ligando de una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3.

Otras realizaciones de la invención proporcionan un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde la afinidad (KD) de dicho segundo sitio de unión a antígeno para una célula ErbB-3 positiva es igual o mayor que la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-2 positiva. A diferencia de los compuestos biespecíficos de la técnica anterior, como por ejemplo MM-111 de Merrimack Pharmaceuticals, que tienen una mayor afinidad por ErbB-2 que por ErbB-3, la presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos que tienen un brazo específico de ErbB-3 con una afinidad para ErbB-3 en células que es mayor que la afinidad del brazo específico de ErbB-2 por ErbB-2 en células. Dichos anticuerpos biespecíficos son más capaces de unirse a ErbB-3, a pesar de la baja concentración de ErbB-3 en la superficie celular. Esto proporciona la ventaja de que la actividad funcional contra ErbB-3 se mejora en comparación con los compuestos de la técnica anterior, lo que significa que estos anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención son más capaces de contrarrestar la actividad de ErbB-3 (tal como el crecimiento inducido por ligando).

Como se usa en este documento, el término "afinidad" se refiere al valor de KD.

La afinidad (KD) de dicho segundo sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-3 positiva es preferiblemente menor o igual a 2.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.39 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.99 nM. En una realización preferida, la afinidad de dicho segundo sitio de unión a antígeno por ErbB-3 en células SK-BR-3 es menor o igual a 2.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.39 nM, preferiblemente menor o igual a 0.99 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del intervalo de 1.39-0.59 nM. En una realización preferida, la afinidad de dicho segundo sitio de unión al antígeno por ErbB-3 en células BT-474 es menor o igual a 2.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.0 nM, más preferiblemente inferior a 0.5 nM, más preferiblemente inferior o igual a 0.31 nM, más preferiblemente inferior o igual a 0.23 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del intervalo de 0.31-0.15 nM. Las afinidades mencionadas anteriormente se miden preferiblemente usando medidas de afinidad celular en estado estacionario, en las que las células se incuban a 4°C usando anticuerpos marcados radiactivamente, donde después se mide la radioactividad unida a las células, como se describe en los Ejemplos.

La afinidad (KD) de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-2 positiva es preferiblemente menor o igual a 5.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.9 nM. En una realización preferida, la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por ErbB-2 en células SK-BR-3 es menor o igual a 5.0 nM, preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 4.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 2.3 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del intervalo de 3.0 a 1.6 nM. En una realización preferida, la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por ErbB-2 en células BT-474 es menor o igual a 5.0 nM, preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.9 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del rango de 4.5-3.3 nM. Las afinidades mencionadas anteriormente se miden preferiblemente usando medidas de afinidad celular en estado estacionario, en las que las células se incuban a 4°C usando anticuerpos marcados radiactivamente, donde después se mide la radioactividad unida a las células, como se describe en los Ejemplos.

En una realización preferida, se proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, en donde la afinidad (KD) de dicho anticuerpo biespecífico por las células BT-474 es menor o igual a 5.0 nM, preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 4.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.7 nM, preferiblemente menor o igual a 3.2 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del intervalo de 3.7 a 2.7 nM. En una realización preferida, se proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, en donde la afinidad de dicho anticuerpo biespecífico por las células SK-BR-3 es menor o igual a 5.0 nM, preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 4.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.0 nM, preferiblemente menor o igual a 2.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 2.0 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del rango de 2.4-1.6 nM. De nuevo, las afinidades mencionadas anteriormente se miden preferiblemente usando mediciones de afinidad celular en estado estacionario, en donde las células se incuban a 4°C usando anticuerpo marcado radiactivamente, donde después se mide la radioactividad unida a las células, como se describe en los Ejemplos.

Otras realizaciones preferidas de la invención proporcionan un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde la afinidad (KD) de dicha segunda unión de antígeno El sitio para una célula ErbB-3 positiva es igual o mayor que la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-2 positiva, y donde el anticuerpo puede reducir una función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 en una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3. Dicho anticuerpo puede reducir preferiblemente el crecimiento inducido por ligando de una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3.

Los anticuerpos mencionados anteriormente de acuerdo con la invención con una alta afinidad por ErbB-3 se unen preferiblemente al dominio I de ErbB2 y/o al dominio III de ErbB-3. Se proporciona, además, por lo tanto, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-3, en donde la afinidad (KD) de dicho segundo sitio de unión al antígeno para una célula ErbB-3 positiva es igual o mayor que la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-2 positiva. También se proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une al dominio III de ErbB-3, en donde la afinidad de dicho segundo sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-3 positiva es igual o superior a la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-2 positiva. En una realización particularmente preferida se proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une al dominio III de ErbB-3, en donde la afinidad de dicho segundo sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-3 positiva es igual o superior a la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-2 positiva.

Dicho segundo sitio de unión al antígeno se une preferiblemente al dominio III de ErbB-3 y tiene una afinidad (KD) por una célula positiva a ErbB-3 que es menor o igual a 2.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.5 nM, preferiblemente menor o igual a 1.39 nM, más preferiblemente menor o igual a 0,99 nM. En una realización preferida, dicho segundo sitio de unión al antígeno se une al dominio III de ErbB-3 y tiene una afinidad por ErbB-3 en las células SK-BR-3 que es menor o igual a 2.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.5 nM, preferiblemente menor o igual a 1.39 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.99 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del intervalo de 1.39-0.59 nM. En una realización preferida, dicho segundo sitio de unión al antígeno se une al dominio III de ErbB-3 y tiene una afinidad por ErbB-3 en células BT-474 que es menor o igual a 2.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.31 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.23 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del intervalo de 0.31-0.15 nM.

Dicho primer sitio de unión al antígeno se une preferiblemente al dominio I de ErbB-2 y tiene una afinidad (KD) por una célula positiva para ErbB-2 que es menor o igual a 5.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.9 nM. En una realización preferida, dicho primer sitio de unión al antígeno se une al dominio I de ErbB-2 y tiene una afinidad por ErbB-2 en las células SK-BR-3 que es menor o igual a 5.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 4.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 2.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 2.3 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del intervalo de 3.0 a 1.6 nM. La afinidad de dicho anticuerpo biespecífico por las células SK-BR-3 es preferiblemente menor o igual a 5.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 4.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.5 nM, más preferiblemente inferior o igual a 3.0 nM, más preferiblemente inferior o igual a 2.5 nM, más preferiblemente inferior o igual a 2.4 nM, más preferiblemente inferior o igual a 2.0 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del rango de 2.4-1.6 nM.

En una realización preferida, dicho primer sitio de unión al antígeno se une al dominio I de ErbB-2 y tiene una afinidad (KD) por ErbB-2 en células BT-474 que es menor o igual a 5.0 nM, más preferiblemente menor mayor o igual a 4.5 nM, preferiblemente menor o igual a 3.9 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del rango de 4.5-3.3 nM. La afinidad de dicho anticuerpo biespecífico por las células BT-474 es preferiblemente menor o igual a 5.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 4.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.7 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.2 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del intervalo de 3.7 a 2.7 nM.

De nuevo, las afinidades mencionadas anteriormente se miden preferiblemente usando mediciones de afinidad celular en estado estacionario, en donde las células se incuban a 4°C usando anticuerpo marcado radiactivamente, donde después se mide la radioactividad unida a las células, como se describe en los Ejemplos.

Otra realización preferida proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde el anticuerpo puede reducir una función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 en una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3, en donde dicho anticuerpo biespecífico no afecta significativamente la supervivencia de los cardiomiocitos. La cardiotoxicidad es un factor de riesgo conocido en las terapias dirigidas a ErbB-2 y la frecuencia de complicaciones aumenta cuando se usa trastuzumab junto con antraciclinas, lo que induce estrés cardíaco. Por ejemplo, la combinación de doxíciclina (DOX) con trastuzumab induce efectos secundarios cardíacos graves. Los estudios clínicos han estimado que entre el 5% y el 10% de los pacientes que reciben trastuzumab en el contexto

adyuvante del cáncer de mama desarrollan disfunción cardíaca (Guarneri et al., J Clin Oncol., 1985, 3: 818-26; Ewer MS et al., Nat Rev Cardiol 2010; 7: 564-75). Sin embargo, en un estudio retrospectivo, se demostró que el riesgo de desarrollar disfunción cardíaca asintomática es en realidad tan alto como alrededor del 25% cuando se usa trastuzumab como adyuvante con DOX (Wadhwa et al., Breast Cancer Res Treat 2009; 117: 357-64). Como se muestra en los Ejemplos, la presente invención proporciona anticuerpos que se dirigen a ErbB-2 y que no, o en un grado significativamente menor en comparación con trastuzumab y pertuzumab, afectan la supervivencia de los cardiomiocitos. Esto proporciona una ventaja importante ya que se reduce la cardiotoxicidad. Esto ya es ventajoso para las personas que no padecen una función cardíaca deteriorada, y más aún para las personas que padecen una función cardíaca deteriorada, o que están en riesgo de sufrirla, como por ejemplo los sujetos que padecen insuficiencia cardíaca congestiva (ICC)), disfunción ventricular izquierda (LVD) y/o una fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF) disminuida $\geq 10\%$, y/o sujetos que han tenido un infarto de miocardio. Por tanto, se prefieren los anticuerpos de acuerdo con la invención que no afecten significativamente a la supervivencia de los cardiomiocitos. In vitro, la función de los cardiomiocitos se mide, por ejemplo, determinando la viabilidad de los cardiomiocitos, determinando el BNP (péptido natriurético de tipo B, que es un biomarcador cardíaco), determinando la prolongación del QT y/o determinando el potencial de membrana mitocondrial.

Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferiblemente un primer sitio de unión a antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une al dominio III de ErbB-3. Una realización proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención que no afecta significativamente la supervivencia de los cardiomiocitos, que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde la afinidad de dicho segundo sitio de unión al antígeno para una célula ErbB-3 positiva es igual o mayor que la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-2 positiva. La afinidad de dicho segundo sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-3 positiva es preferiblemente menor o igual a 2.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.39 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.99 nM. La afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula positiva para ErbB-2 es preferiblemente menor o igual a 5.0 nM, preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, preferiblemente menor o igual a 4.0 nM.

En una realización preferida, dicho anticuerpo que no afecta significativamente la supervivencia de los cardiomiocitos comprende:

- al menos la secuencia de CDR3, preferiblemente al menos las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, o al menos la secuencia de la región variable de la cadena pesada, de una región variable de la cadena pesada específica de ErbB-2 seleccionada del grupo que consiste en MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 y MF1898 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, o una secuencia de región variable de cadena pesada que difiere en como máximo 15 amino ácidos, preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, más preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, de la cadena pesada mencionada secuencias de regiones variables; y/o

- al menos la secuencia CDR3, preferiblemente al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, o al menos la secuencia de la región variable de la cadena pesada, de una región variable de la cadena pesada específica de ErbB-3 seleccionada del grupo que consiste en MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37, o una secuencia de región variable de cadena pesada que difiere en como máximo 15 aminoácidos, preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, más preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, de las secuencias de la región variable de la cadena pesada enumeradas. En una realización preferida, dicho anticuerpo es PB4188.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención, que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde dicho anticuerpo comprende un sitio que une al menos un residuo de aminoácido del dominio I de ErbB-2 seleccionado del grupo que consiste en T144, T164, R166, P172, G179, S180 y R181, y residuos de aminoácidos expuestos en la superficie que se encuentran dentro de aproximadamente 5 aminoácidos posiciones ácidas de T144, T164, R166, P172, G179, S180 o R181. La numeración de los residuos de aminoácidos es la del Protein Data Bank (PDB) ID #1S78. Como se muestra en los Ejemplos, los anticuerpos que se unen a esta región del dominio I de ErbB-2 exhiben características de unión particularmente buenas y son capaces de contrarrestar la actividad de las células positivas para ErbB-2 (como la función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 en un ErbB-2 y ErbB-3 positivo y/o crecimiento inducido por ligando de dicha célula). Además, dichos anticuerpos son particularmente adecuados para la terapia de combinación con anticuerpos monoclonales anti-ErbB-2 actualmente conocidos como trastuzumab (que se une al dominio IV de ErbB-2) y pertuzumab (que se une al dominio II de ErbB-2) porque se unen a diferentes dominios de ErbB-2. Por tanto, estos anticuerpos pueden usarse simultáneamente sin competencia por el mismo epítipo. El término "residuos de aminoácidos expuestos a la superficie que se encuentran dentro de aproximadamente 5 posiciones de aminoácidos de T144, T164, R166, P172, G179, S180 o R181" se refiere a residuos de aminoácidos que están en la secuencia de aminoácidos primaria localizados dentro de aproximadamente primeros cinco residuos de aminoácidos adyacentes a los residuos enumerados y que están al menos en parte expuestos al exterior de la proteína, de modo que puedan unirse mediante anticuerpos (véase, por ejemplo, la Figura 21B). Preferiblemente, dicho residuo de aminoácido ubicado dentro de aproximadamente 5 posiciones de aminoácidos de T144, T164, R166,

P172, G179, S180 o R181 se selecciona del grupo que consiste en L139, C140, Y141, Q142, D143, 1145, L146, W147, K148, D149, L159, T160, L161, 1162, D163, N165, S167, R168, A169, C170, H171, C173, S174, P175, M176, C177, K178, C182, W183, G184, E185 y S186. Preferiblemente, dicho anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno que une al menos 2 o al menos 3 residuos de aminoácidos del dominio I de ErbB-2 seleccionados del grupo que consiste en T144, T164, R166, P172, G179, S180 y R181, y residuos de aminoácidos expuestos a la superficie que se encuentran dentro de 5 posiciones de aminoácidos de T144, T164, R166, P172, G179, S180 o R181.

En una realización preferida, se proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, en donde dicho anticuerpo comprende un sitio de unión al antígeno que se une al menos a T144, R166 y R181 del dominio I de ErbB-2. Otra realización proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, en donde dicho anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno que se une al menos a T144, R166, P172, G179 y R181 del dominio I de ErbB-2. Otra realización proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, en donde dicho anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno que se une al menos a T144, T164, R166, P172, G179, S180 y R181 del dominio I de ErbB-2.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde dicho anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno que se une al menos un aminoácido del dominio III de ErbB-3 seleccionado del grupo que consiste en R426 y residuos de aminoácidos expuestos en la superficie que están ubicados dentro de 11.2 Å de R426 en la proteína ErbB-3 nativa. La numeración de los residuos de aminoácidos es la del Protein Data Bank (PDB) ID #4P59. Como se muestra en los ejemplos, los anticuerpos que se unen a esta región del dominio III de ErbB-3 exhiben características de unión particularmente buenas y son capaces de contrarrestar la actividad de las células positivas para ErbB-3 (como la función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 en un ErbB-2 y ErbB-3 positivo y/o crecimiento inducido por ligando de dicha célula). El término "residuos de aminoácidos expuestos a la superficie que se encuentran dentro de 11.2 Å de R426 en la proteína ErbB-3 nativa" se refiere a residuos de aminoácidos que están en la estructura terciaria de la proteína ErbB-3 espaciadamente ubicados dentro de 11.2 Å de R426 y que están al menos en parte expuestas al exterior de la proteína, de modo que puedan unirse mediante anticuerpos. Preferiblemente, dichos residuos de aminoácidos que se encuentran dentro de 11.2 Å de R426 en la proteína ErbB-3 nativa se seleccionan del grupo que consiste en L423, Y424, N425, G427, G452, R453, Y455, E480, R481, L482, D483 y K485 (véase, por ejemplo, la Figura 21C y la Tabla 15). En una realización preferida, se proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, en donde dicho anticuerpo comprende un sitio de unión al antígeno que se une al menos a R426 del dominio III de ErbB-3. Preferiblemente, dicho anticuerpo comprende un sitio de unión al antígeno que se une al menos a R426 del dominio III de ErbB-3.

Un anticuerpo biespecífico de la invención se afucosila preferiblemente para mejorar la actividad de ADCC. Un anticuerpo biespecífico de la invención comprende preferiblemente una cantidad reducida de fucosilación de la estructura de carbohidrato unida a N en la región Fc, en comparación con el mismo anticuerpo producido en una célula CHO normal.

Un anticuerpo biespecífico de la presente invención se usa preferiblemente en humanos. Con este fin, un anticuerpo biespecífico de la invención es preferiblemente un anticuerpo humano o humanizado.

La tolerancia de un ser humano a un polipéptido se rige por muchos aspectos diferentes. La inmunidad, ya sea mediada por células T, mediada por células B u otra, es una de las variables que se engloban en la tolerancia del ser humano a un polipéptido. La región constante de un anticuerpo biespecífico de la presente invención es preferiblemente una región constante humana. La región constante puede contener una o más, preferiblemente no más de 10, preferiblemente no más de 5 diferencias de aminoácidos con la región constante de un anticuerpo humano de origen natural. Se prefiere que la parte constante se derive completamente de un anticuerpo humano de origen natural. Varios anticuerpos producidos en la presente se derivan de una biblioteca de dominio variable de anticuerpos humanos. Como tales, estos dominios variables son humanos. Las regiones CDR únicas pueden derivarse de humanos, ser sintéticas o derivadas de otro organismo. La región variable se considera una región variable humana cuando tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de un anticuerpo humano de origen natural, pero para la región CDR. La región variable de un VH de unión a ErbB-2, un VH de unión a ErbB-3 o una cadena liviana en un anticuerpo de la invención puede contener una o más, preferiblemente no más de 10, preferiblemente no más de 5 diferencias de aminoácidos con la región variable de un anticuerpo humano de origen natural, sin contar las posibles diferencias en la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR. Tales mutaciones ocurren también en la naturaleza en el contexto de la hipermutación somática.

Los anticuerpos pueden derivarse de varias especies animales, al menos con respecto a la región variable de la cadena pesada. Es una práctica común humanizar, por ejemplo, tales regiones variables de cadena pesada murina. Hay varias formas en las que esto se puede lograr, entre las que están el injerto de CDR en una región variable de cadena pesada humana con una estructura 3D que coincide con la estructura 3-D de la región variable de cadena pesada murina; desinmunización de la región variable de la cadena pesada murina, preferiblemente realizada mediante la eliminación de epítopos de células T o B conocidos o sospechosos de la región variable de la cadena pesada murina. La eliminación se realiza típicamente sustituyendo uno o más de los aminoácidos en el epítipo por otro aminoácido (típicamente conservador), de modo que la secuencia del epítipo se modifica de manera que ya no es un epítipo de célula T o B. Tales regiones variables de cadena pesada murina desinmunizadas son menos

inmunogénicas en humanos que la región variable de cadena pesada murina original. Preferiblemente, una región o dominio variable de la invención se humaniza más, tal como, por ejemplo, enchapado. Mediante el uso de técnicas de recubrimiento, los residuos exteriores que el sistema inmunitario encuentra fácilmente se reemplazan selectivamente con residuos humanos para proporcionar una molécula híbrida que comprende una superficie recubierta débilmente

5 inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica. Un animal como se usa en la invención es preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un primate, lo más preferiblemente un ser humano.

Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención comprende preferiblemente una región constante de un anticuerpo humano. Según las diferencias en sus dominios constantes de cadena pesada, los anticuerpos se agrupan en cinco clases o isotipos: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Estas clases o isotipos comprenden al menos una de dichas cadenas pesadas que se nombra con una letra griega correspondiente. En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención en donde dicha región constante se selecciona del grupo de regiones constantes de IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, más preferiblemente dicha región constante comprende una región constante de IgG, más preferiblemente una región constante de IgG1, preferiblemente una región constante de IgG1 mutada. En la naturaleza ocurre alguna variación en la región constante de IgG1, como por ejemplo los alotipos G1m1, 17 y G1m3, y/o se permite sin cambiar las propiedades inmunológicas del anticuerpo resultante. Típicamente, se permiten en la región constante entre aproximadamente 1-10 inserciones de aminoácidos, eliminaciones, sustituciones o una combinación de las mismas.

10 15

La invención en una realización proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable que se une a ErbB-2, en donde dicho anticuerpo comprende al menos la secuencia CDR3 de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-2 seleccionada del grupo que consiste en MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 y MF1898 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, o donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada en la secuencia de CDR3 que difiere la mayoría de tres, preferiblemente en como máximo dos, preferiblemente en no más de un aminoácido de una secuencia CDR3 de un VH seleccionado del grupo que consiste en MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 y MF1898 como se muestra en la Figura 16A o la Figura 16E. Dicho anticuerpo preferiblemente comprende al menos la secuencia CDR3 de MF1849, MF2971, MF3958, MF3004 o MF3991, lo más preferiblemente al menos la secuencia CDR3 de MF3958.

20 25

Dicho anticuerpo preferiblemente comprende al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-2 seleccionada del grupo que consiste en MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 y MF1898 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, o CDR1 de cadena pesada, CDR2 y CDR3 como máximo tres, preferiblemente en como máximo dos, preferiblemente en como máximo un aminoácido de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 o MF1898. Dicho anticuerpo preferiblemente comprende al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de MF1849, MF2971, MF3958, MF3004 o MF3991, lo más preferiblemente al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de MF3958.

30 35

La invención también proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable que se une a ErbB-3, en donde dicho anticuerpo comprende al menos la secuencia CDR3 de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-3 seleccionada del grupo que consiste en MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37, o donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR3 de cadena pesada que difiere en como máximo tres, preferiblemente en como máximo dos, preferiblemente en no más de un aminoácido de una secuencia CDR3 de un VH seleccionado del grupo que consiste en MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37. Dicho anticuerpo preferiblemente comprende al menos la secuencia CDR3 de MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 o MF6065, lo más preferiblemente al menos la secuencia CDR3 de MF3178.

40 45

Dicho anticuerpo preferiblemente comprende al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-3 seleccionada del grupo que consiste en MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37, o secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que difieren en como máximo tres, preferiblemente en como máximo dos, preferiblemente en como máximo un aminoácido de la CDR1, CDR2 y Secuencias CDR3 de MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074. Dicho anticuerpo preferiblemente comprende al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 o MF6065, lo más preferiblemente al menos la secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de MF3178.

50 55 60

La invención en una realización proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde dicho primer sitio de unión a antígeno comprende al menos la secuencia CDR3 de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-2 seleccionada del grupo que consiste en MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 y MF1898 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, o una secuencia CDR3 de cadena pesada que difiere como máximo en tres en como máximo dos, preferiblemente en no más de un aminoácido de una secuencia CDR3 de un VH seleccionado del grupo que consiste en MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 y MF1898 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, y en donde dicho segundo sitio de unión al antígeno comprende al menos la secuencia CDR3 de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-3 seleccionada del grupo que consiste en MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37, o una secuencia de CDR3 de cadena pesada que difiere en como máximo tres, preferiblemente en como máximo dos, preferiblemente en no más de un aminoácido de una secuencia CDR3 de un VH seleccionado del grupo que consiste en MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37. Dicho primer sitio de unión a antígeno comprende preferiblemente al menos la secuencia CDR3 de MF1849, MF2971, MF3958, MF3004 o MF3991, lo más preferiblemente al menos la secuencia CDR3 de MF3958 y dicho El segundo sitio de unión al antígeno comprende preferiblemente al menos la secuencia CDR3 de MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 o MF6065, lo más preferiblemente al menos la secuencia CDR3 de MF3178.

Dicho primer sitio de unión al antígeno comprende preferiblemente al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-2 seleccionada del grupo que consiste en MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 y MF1898 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, o CDR1 de cadena pesada, CDR2 y CDR3 como máximo tres, preferiblemente en como máximo dos, preferiblemente en como máximo un aminoácido de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 o MF1898, y dicho segundo sitio de unión al antígeno comprende preferiblemente al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-3 seleccionada del grupo que consiste en MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37, o secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que difieren en como máximo tres, preferiblemente en como máximo dos, preferiblemente en como máximo un aminoácido de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074 como se muestra en la Figura 16B o la Figura 16E o la Figura 37. Dicho primer sitio de unión al antígeno comprende preferiblemente al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de MF1849, MF2971, MF3958, MF3004 o MF3991, lo más preferiblemente al menos la CDR1, Las secuencias CDR2 y CDR3 de MF3958, y dicho segundo sitio de unión al antígeno comprende preferiblemente al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 o MF6065, lo más preferiblemente al menos la secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de MF3178.

Una realización preferida proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-3, en donde dicho primer sitio de unión a antígeno comprende al menos la secuencia CDR3 de MF3958, o una secuencia de CDR3 que difiere en como máximo tres, preferiblemente en como máximo dos, preferiblemente en no más de un aminoácido de la secuencia CDR3 de MF3958, y donde dicho segundo sitio de unión al antígeno comprende al menos la secuencia CDR3 de MF3178, o una secuencia de CDR3 que difiere como máximo en tres, preferiblemente en como máximo dos, preferiblemente en no más de un aminoácido de la secuencia CDR3 de MF3178.

La invención en una realización proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde dicho primer sitio de unión a antígeno comprende al menos la CDR1, Secuencias CDR2 y CDR3 de MF3958, o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que difieren en como máximo tres, preferiblemente en como máximo dos, preferiblemente en como máximo un aminoácido de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de MF3958, y en donde dicho segundo antígeno -el sitio de unión comprende al menos la secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de MF3178, o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que difieren en como máximo tres, preferiblemente en como máximo dos, preferiblemente en como máximo un aminoácido de la CDR1, CDR2 y CDR3 secuencias de MF3178.

La invención en una realización proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-3, en donde dicho primer sitio de unión al antígeno comprende al menos la secuencia CDR3 de MF3958 y en donde dicho segundo sitio de unión al antígeno comprende al menos la secuencia CDR3 de MF3178.

La invención en una realización proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-3, en donde dicho primer sitio de unión al antígeno comprende al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de MF3958 y en donde dicho segundo sitio de unión al antígeno comprende al menos la secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de MF3178.

5 Las secuencias de CDR se varían, por ejemplo, con fines de optimización, preferiblemente para mejorar la eficacia de unión o la estabilidad del anticuerpo. La optimización se realiza, por ejemplo, mediante procedimientos de mutagénesis en los que, después de probar la estabilidad y/o la afinidad de unión de los anticuerpos resultantes, se selecciona preferiblemente una secuencia mejorada de CDR específica de ErbB-2 o ErbB-3. Un experto en la materia es capaz de generar variantes de anticuerpos que comprendan al menos una secuencia de CDR alterada de acuerdo con la
10 invención. Por ejemplo, se aplica la sustitución conservadora de aminoácidos. Ejemplos de sustitución conservadora de aminoácidos incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro residuo hidrófobo, y la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, como la sustitución de lisina por arginina, ácido glutámico para ácido aspártico o glutamina para asparagina.

15 La invención en una realización proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable que se une a ErbB-2, en donde la cadena VH de dicho dominio variable comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (es MF2971 humanizado); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (es MF3004 humanizado); MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; MF3001, MF3003 o MF1898 como se muestra en la Figura 16A o la Figura 16E; o comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (es MF2971 humanizado); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (es MF3004 humanizado);
20 MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; MF3001, MF3003 o MF1898 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de cadena VH mencionada anteriormente de la Figura 16A o la Figura 16E. La cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-2 comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de:

25 - MF1849; o

- MF2971 o una versión humanizada del mismo, en donde dicha versión humanizada preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de MF3958; o

- MF3004 o una versión humanizada del mismo, en donde dicha versión humanizada preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de MF3991;

30 - como se muestra en la Figura 16A. En una realización, la cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-2 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF1849; o MF2971 o una versión humanizada del mismo, en donde dicha versión humanizada preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de MF3958; o MF3004 o una versión humanizada del mismo, en donde dicha versión humanizada preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de MF3991, en donde las secuencias VH enumeradas tienen como máximo 15, preferiblemente 1, 2,
35 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia respectiva representada en la Figura 16A. En una realización preferida, la cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-2 comprende la secuencia de aminoácidos de MF3958; o comprende la secuencia de aminoácidos de MF3958 representada en la figura 16A que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5,
40 inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de la cadena VH. El anticuerpo que comprende un dominio variable que se une a ErbB-2 es preferiblemente un anticuerpo biespecífico que preferiblemente comprende además un dominio variable que se une a ErbB-3. La cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-3 comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060;
45 MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074 como se muestra en la Figura 16B o la Figura 16E o la Figura 37; o comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070;
50 MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37 que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de la cadena VH de la Figura 16B o la Figura 16E o Figura 37. La cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-3 comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 o MF6065; o comprende la secuencia de aminoácidos de MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 o MF6065 que tiene
55 como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de cadena VH respectiva de la Figura 16B o Figura 37. En una realización preferida, la cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-3 comprende la secuencia de aminoácidos de MF3178; o comprende la secuencia de aminoácidos de MF3178 representada en la Figura 16B que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5,
60 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de la cadena VH. Preferiblemente, las

inserciones, eliminaciones y sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente no están presentes en la región CDR3. Las inserciones, eliminaciones y sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente tampoco están preferiblemente presentes en las regiones CDR1 y CDR2. Las inserciones, eliminaciones y sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente tampoco están preferiblemente presentes en la región FR4.

5 La invención proporciona además un anticuerpo que comprende un dominio variable que se une a ErbB-3, en donde la cadena VH de dicha región variable comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074 como se muestra en la Figura 16B o la Figura 16E o la Figura 37, o comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH 10 MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37 que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a dicha secuencia de cadena VH. La cadena VH del 15 dominio variable que se une a ErbB3 comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 o MF6065; o comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 o MF6065 que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a dicha secuencia de cadena VH. En una realización preferida, la 20 cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-3 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178 representada en la Figura 16B; o comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178 representada en la Figura 16B que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de la cadena VH. El anticuerpo que comprende un dominio variable que se une a ErbB-3 es preferiblemente un anticuerpo biespecífico que preferiblemente comprende además un dominio variable que se une a ErbB-2. La cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-2 preferiblemente 25 comprende la secuencia de aminoácidos de una cadena VH de la Figura 16A o la Figura 16E. La cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-2 comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de MF1849; o MF2971 o una versión humanizada del mismo, en donde dicha versión humanizada preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de MF3958; o MF3004 o una versión humanizada del mismo, en donde dicha versión humanizada preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de MF3991 como se muestra en la Figura 16A. En una 30 realización, las secuencias VH de unión a ErbB-2 enumeradas tienen como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia respectiva representada en la Figura 16A. En una realización preferida, dicha cadena VH de unión a ErbB-2 de la Figura 16A comprende la secuencia de aminoácidos de MF3958; o comprende la secuencia de aminoácidos de MF3958 que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, aminoácidos inserciones, eliminaciones, sustituciones o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de la cadena VH. Preferiblemente, las inserciones, eliminaciones y sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente no están 35 presentes en la región CDR3. Las inserciones, eliminaciones y sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente tampoco están preferiblemente presentes en las regiones CDR1 y CDR2. Las inserciones, eliminaciones y sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente tampoco están preferiblemente presentes en la región FR4.

45 Se proporciona además un anticuerpo de acuerdo con la invención, en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada específica de ErbB-2 seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de región variable de cadena pesada de MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 y MF1898 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, o donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que difiere como máximo 15, preferiblemente en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, aminoácidos de las secuencias de la región variable de la cadena pesada de MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 o MF1898.

55 Se proporciona además un anticuerpo de acuerdo con la invención, en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada específica de ErbB-3 seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de región variable de cadena pesada de MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37, o donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que difiere en como máximo 15, preferiblemente en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, aminoácidos 60 de las secuencias de la región variable de la cadena pesada de MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074.

La invención en una realización proporciona un anticuerpo que comprende dos sitios de unión a antígeno que se unen a ErbB-2, en donde al menos uno de dichos sitios de unión a antígeno se une al dominio I de ErbB-2. Preferiblemente, ambos sitios de unión a antígeno se unen al dominio I de ErbB-2. Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para la terapia de combinación con moléculas de unión anti-ErbB-2 actualmente utilizadas que no se unen al dominio I de ErbB-2, como trastuzumab que se une al dominio IV de ErbB-2 y pertuzumab que se une al dominio II. de ErbB-2, porque entonces las diferentes moléculas de unión no compiten entre sí por el mismo epítipo.

Se proporciona además un anticuerpo que comprende dos sitios de unión a antígeno que se unen a ErbB-2, en donde al menos uno de dichos sitios de unión a antígeno se une al dominio I de ErbB-2 y en donde la afinidad (KD) de dicho al menos un antígeno-sitio de unión para una célula positiva para ErbB-2 es menor o igual a 5.0 nM, preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.9 nM. Preferiblemente, ambos sitios de unión a antígeno se unen al dominio I de ErbB-2. En una realización preferida, la afinidad de dicho al menos un sitio de unión a antígeno por ErbB-2 en células SK-BR-3 es menor o igual a 5.0 nM, preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 4.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 2.3 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del intervalo de 3.0 a 1.6 nM. En una realización preferida, la afinidad de dicho al menos un sitio de unión a antígeno por ErbB-2 en células BT-474 es menor o igual a 5.0 nM, preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 3.9 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del rango de 4.5-3.3 nM.

Las afinidades mencionadas anteriormente se miden preferiblemente usando medidas de afinidad celular en estado estacionario, en las que las células se incuban a 4°C usando anticuerpo marcado radiactivamente, y después se mide la radioactividad unida a las células, como se describe en los Ejemplos.

La invención proporciona además un anticuerpo que comprende dos dominios variables que se unen a ErbB-2, en donde una cadena VH de dichos dominios variables comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (es MF2971 humanizado); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (es MF3004 humanizado); MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; MF3001, MF3003 o MF1898 como se muestra en la Figura 16A o la Figura 16E; o la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF2926; MF2930; MF1849; MF2973; MF3004; MF3958 (es MF2971 humanizado); MF2971; MF3025; MF2916; MF3991 (es MF3004 humanizado); MF3031; MF2889; MF2913; MF1847; cadenas VH MF3001, MF3003 o MF1898 como se muestra en la Figura 16A o la Figura 16E, que tienen como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia respectiva representada en la Figura 16A o la Figura 16E. Dicho VH preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF1849; o MF2971 o una versión humanizada del mismo, en donde dicha versión humanizada preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de MF3958; o MF3004 o una versión humanizada del mismo, en donde dicha versión humanizada preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de MF3991 como se muestra en la Figura 16A; o comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF1849; o MF2971 o una versión humanizada del mismo, en donde dicha versión humanizada preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de MF3958; o MF3004 o una versión humanizada del mismo, en donde dicha versión humanizada preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de MF3991 como se muestra en la Figura 16A que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia respectiva representada en la Figura 16A. Los dominios variables del anticuerpo comprenden preferiblemente cadenas VH idénticas, que preferiblemente tienen una secuencia como se muestra en la Figura 16A o la Figura 16E. Un anticuerpo con dominios variables con cadenas VH idénticas no es un anticuerpo bispecífico. Las cadenas VH son idénticas para la presente invención si comprenden la misma secuencia de cadena VH como se muestra en la Figura 16A o la Figura 16E o la Figura 37, o la misma secuencia de cadena VH pero para 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones y eliminaciones de aminoácidos, sustituciones o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia respectiva representada en la Figura 16A o la Figura 16E o la Figura 37.

La invención en una realización proporciona un anticuerpo que comprende dos sitios de unión a antígeno que se unen a ErbB-3, en donde al menos uno de dichos sitios de unión a antígeno se une al dominio III de ErbB-3. Preferiblemente, ambos sitios de unión al antígeno se unen al dominio III de ErbB-3. Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para la terapia de combinación con moléculas de unión anti-ErbB-3 actualmente utilizadas que no se unen al dominio III de ErbB-3, como MM-121 (#Ab6) y RG7116 que se unen al dominio I de ErbB-3, porque luego las diferentes moléculas de unión no compiten entre sí por el mismo epítipo.

Se proporciona además un anticuerpo que comprende dos sitios de unión a antígeno que se unen a ErbB-3, en donde al menos uno de dichos sitios de unión a antígeno se une al dominio III de ErbB-3 y en donde la afinidad (KD) de dicho al menos un sitio de unión a antígeno para una célula ErbB-3 positiva es menor o igual a 2.0 nM, preferiblemente menor o igual a 1.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.39 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.99 nM. Preferiblemente, ambos sitios de unión al antígeno se unen al dominio III de ErbB-3. En una realización preferida, la afinidad de dicho al menos un sitio de unión al antígeno por ErbB-3 en células SK-BR-3 es menor o igual a 2.0 nM, preferiblemente menor o igual a 1.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 2.0 nM igual a 1.39 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.99 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del intervalo de 1.39-0.59 nM. En una realización preferida, la afinidad de dicho al menos un sitio de unión a antígeno por ErbB-3 en células BT-474

es menor o igual a 2.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.5 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.31 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.23 nM. En una realización, dicha afinidad está dentro del intervalo de 0.31-0.15 nM.

De nuevo, las afinidades mencionadas anteriormente se miden preferiblemente usando mediciones de afinidad celular en estado estacionario, en las que las células se incuban a 4°C usando anticuerpos marcados radiactivamente, y después se mide la radioactividad unida a las células, como se describe en los Ejemplos.

La invención proporciona además un anticuerpo que comprende dos dominios variables que se unen cada uno a ErbB3 en donde un VH de los dominios variables comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074 como se muestra en la Figura 16B o la Figura 16E o la Figura 37; o comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074 que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de los mismos con respecto a cualquiera de dichas secuencias de cadena VH. Dicho VH preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 o MF6065; o comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178, MF3176, MF3163, MF6058, MF6061 o MF6065 que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a cualquiera de dichas secuencias de cadena VH. Dicho VH preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178; o comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178 representada en la Figura 16B que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de la cadena VH de MF3178. Los dominios variables del anticuerpo comprenden preferiblemente cadenas VH idénticas, preferiblemente con una secuencia como la representada en la Figura 16B o la Figura 16E o la Figura 37. Un anticuerpo con dominios variables con cadenas VH idénticas no es un anticuerpo biespecífico. Las cadenas VH son idénticas si comprenden la misma secuencia de cadena VH como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37, o la misma secuencia de cadena VH pero para 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, eliminaciones, sustituciones o inserciones de aminoácidos. una combinación de los mismos con respecto a la secuencia de la cadena VH de la Figura 16B o la Figura 16E o la Figura 37.

Los anticuerpos monoespecíficos de acuerdo con la presente invención que son específicos para ErbB-3 tienen la ventaja de que tienen una mejor actividad funcional contra ErbB-3, en comparación con los compuestos de la técnica anterior como, por ejemplo, MM-121 (#Ab6), lo que significa que estos anticuerpos de acuerdo con la invención son más capaces de contrarrestar la actividad de ErbB-3 (tal como una función de receptor inducida por ligando de ErbB-3 y/o crecimiento inducido por ligando de una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3). Esto se muestra, por ejemplo, en la Tabla 7 y la Figura 38.

En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un dominio variable que se une a ErbB-2, en donde la cadena VH de dicho dominio variable comprende

- la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF1849; o MF2971 o una versión humanizada del mismo, en donde dicha versión humanizada preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de MF3958; o MF3004 o una versión humanizada del mismo, en donde dicha versión humanizada preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de MF3991, como se muestra en la Figura 16A; o comprende

- la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF1849 o MF2971 o una versión humanizada de los mismos, en donde dicha versión humanizada comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de MF3958; o MF3004 o una versión humanizada del mismo, donde dicha versión humanizada preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de MF3991, como se muestra en la Figura 16A que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a dicho VH. Dicho anticuerpo biespecífico de acuerdo con esta realización comprende además preferiblemente un dominio variable que se une a ErbB-3. La cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-3 comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074 como se representa en la Figura 16B o la Figura 16E o la Figura 37, o lo más preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37, que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a cualquiera de dichas secuencias de cadena VH de la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37. La cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-3 preferiblemente

comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178 como se muestra en la Figura 16B o comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178 representada en la Figura 16B que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de la cadena VH de la

5

Figura 16B.

La invención proporciona preferiblemente un anticuerpo biespecífico que comprende un dominio variable que se une a ErbB-2 y un dominio variable que se une a ErbB-3, en donde la cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-2 comprende

- la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3958 como se muestra en la Figura 16A; o

10 - la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3958 como se muestra en la Figura 16A que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a dicho VH; y

en donde la cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-3 comprende

- la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178 como se muestra en la Figura 16B; o

15 - la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178 representada en la Figura 16B que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de la cadena VH de la Figura 16B.

La invención proporciona preferiblemente un anticuerpo biespecífico que comprende un dominio variable que se une a ErbB-2 y un dominio variable que se une a ErbB-3, en donde la cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-2 comprende

20

- la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3991 como se muestra en la Figura 16A; o

- la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3991 como se muestra en la Figura 16A que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a dicho VH; y

25

en donde la cadena VH del dominio variable que se une a ErbB-3 comprende

- la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178 como se muestra en la Figura 16B; o

- la secuencia de aminoácidos de la cadena VH MF3178 representada en la Figura 16B que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de la cadena VH de la

30

Figura 16B.

Cuando se compara con la secuencia en la Figura 16, el comportamiento de una cadena VH típicamente comienza a volverse notablemente diferente cuando tiene más de 15 cambios de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cadena VH como se muestra en la Figura 16. Una cadena VH que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la cadena VH representada en la Figura 16, preferiblemente tiene 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la cadena VH representada en la Figura 16, preferiblemente 1, 2, 3 o 4 inserciones, eliminaciones, sustituciones o una combinación de las mismas, preferiblemente 1, 2 o 3 inserciones, eliminaciones, sustituciones o una combinación de las mismas, más preferiblemente 1 o 2 inserciones, eliminaciones, sustituciones o una combinación de las mismas, y preferiblemente 1 inserción, eliminación, sustitución o una combinación de las mismas con respecto a la cadena VH representado en la Figura 16. El uno o más inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas preferiblemente no están en la región CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena VH. También preferiblemente no están presentes en la región FR4. Una sustitución de aminoácidos es preferiblemente una sustitución de aminoácidos conservadora.

35

40

45

En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 16D, o un anticuerpo biespecífico de la Figura 16D que tiene como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, más preferiblemente como máximo 1, 2, 3, 4 o 5, inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de la

50

Figura 16D, en donde como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos son preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas. Las inserciones, eliminaciones, sustituciones o una combinación de las mismas no están preferiblemente en la región CDR3 de la cadena VH, preferiblemente no en la región CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena VH, y preferiblemente no en la región FR4.

Los métodos racionales han evolucionado hacia la minimización del contenido de residuos no humanos en el contexto humano. Hay varios métodos disponibles para injertar con éxito la propiedad de unión al antígeno de un anticuerpo biespecífico en otro anticuerpo. Las propiedades de unión de los anticuerpos descansan predominantemente en la secuencia exacta de la región CDR3, a menudo respaldada por la secuencia de las regiones CDR1 y CDR2 en el dominio variable combinada con la estructura apropiada del dominio variable en su conjunto. Actualmente están disponibles varios métodos para injertar regiones CDR en un dominio variable adecuado de otro anticuerpo. Algunos de estos métodos se revisan en J.C. Almagro1 y J. Fransson (2008) *Frontiers in Bioscience* 13, 1619-1633, que se incluye aquí como referencia. Por lo tanto, la invención proporciona además un anticuerpo biespecífico humano o humanizado que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3, en donde el dominio variable que comprende el sitio de unión de ErbB-2 comprende una secuencia de VH CDR3 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, y en donde el dominio variable que comprende el sitio de unión de ErbB-3 comprende una región VH CDR3 como se muestra en la Figura 16B o la Figura 16E o la Figura 37. La región variable de VH que comprende la unión de ErbB-2 El sitio comprende preferiblemente la secuencia de la región CDR1, la región CDR2 y la región CDR3 de una cadena VH en la Figura 16A o la Figura 16E. La región variable VH que comprende el sitio de unión ErbB-3 comprende preferiblemente la secuencia de la región CDR1, la región CDR2 y la región CDR3 de una cadena VH en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37. El injerto de CDR también se puede usar para producir una cadena VH con las regiones CDR de un VH de la Figura 16 o Figura 37, pero que tiene un marco diferente. El marco diferente puede ser de otro VH humano o de un mamífero diferente.

Las mencionadas como máximo 15, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos son preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas. Las inserciones, eliminaciones, sustituciones o una combinación de las mismas no están preferiblemente en la región CDR3 de la cadena VH, preferiblemente no en la región CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena VH y preferiblemente no en la región FR4.

La cadena liviana de un dominio variable que comprende una secuencia de cadena pesada variable como se representa en la Figura 16 o Figura 37, es preferiblemente la cadena liviana 012 de la línea germinal, preferiblemente la cadena liviana kappa humana de la línea germinal reordenada IgVk1-39* 01/IGJk1* 01 o un fragmento o un derivado funcional del mismo (nomenclatura según la base de datos IMGT en la red mundial en imgt.org). Se utilizan los términos IgVk1-39* 01/IGJk1*01 de cadena liviana kappa humana de línea germinal reordenada, IGKV1-39/IGKJ1, cadena liviana huVk1-39 o, en resumen, huVk1-39. La cadena liviana puede tener 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas. Las sustituciones de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos mencionadas son preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas, las inserciones, eliminaciones, sustituciones o una combinación de las mismas no están preferiblemente en la región CDR3 de la cadena VL, preferiblemente no en la región CDR1, CDR2 o CDR3 o región FR4 de la cadena VL.

Se encuentran disponibles diversos métodos para producir anticuerpos biespecíficos. Un método implica la expresión de dos cadenas pesadas diferentes y dos cadenas livianas diferentes en una célula y la recolección de anticuerpos producidos por la célula. El anticuerpo producido de esta manera contendrá típicamente una colección de anticuerpos con diferentes combinaciones de cadenas pesadas y ligeras, algunas de las cuales son el anticuerpo biespecífico deseado. El anticuerpo biespecífico se puede purificar posteriormente de la colección. La proporción de anticuerpos biespecíficos con respecto a otros anticuerpos producidos por la célula puede aumentarse de diversas formas. En una realización preferida de la invención, la proporción aumenta expresando no dos cadenas livianas diferentes sino dos cadenas livianas esencialmente idénticas en la célula. Este concepto también se denomina en la técnica método de "cadena liviana común". Cuando las cadenas livianas esencialmente idénticas trabajan junto con las dos cadenas pesadas diferentes, lo que permite la formación de dominios variables con diferentes sitios de unión a antígenos y diferentes propiedades de unión concomitantes, la relación de anticuerpo biespecífico a otro anticuerpo producido por la célula mejora significativamente con respecto a la expresión de dos cadenas livianas diferentes. La proporción de anticuerpo biespecífico que produce la célula puede mejorarse aún más estimulando el emparejamiento de dos cadenas pesadas diferentes entre sí sobre el emparejamiento de dos cadenas pesadas idénticas. La técnica describe varias formas en las que se puede lograr dicha heterodimerización de cadenas pesadas. Una forma es generar anticuerpos biespecíficos "de botón en ojal". Véase la Solicitud de Patente Estadounidense 20030078385 (Arathoon et al. - Genentech). Otro método preferido se describe en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos 61/635,935, que ha sido seguida por la solicitud regular de Estados Unidos No. 13/866,747 y la solicitud PCT No. PCT/NL2013/050294 (WO 2013/157954 A1), que se incorporan aquí por referencia. Se describen métodos y medios para producir anticuerpos biespecíficos a partir de una sola célula, mediante los cuales se proporcionan medios que favorecen la formación de anticuerpos biespecíficos sobre la formación de anticuerpos mono-específicos. Estos métodos también se pueden emplear favorablemente en la presente invención. Por tanto, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención (a partir de una única célula), en donde dicho anticuerpo biespecífico comprende dos dominios CH3 que son capaces de formar una interfaz, comprendiendo dicho método proporcionar en dicha célula a) una primera molécula de ácido que codifica un primer dominio CH3 que comprende una cadena pesada, b) una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un segundo dominio CH3 que comprende una cadena pesada, donde dichas moléculas de ácido nucleico están provistas de medios para el apareamiento preferencial de dicho primer y segundo dominio CH3 que comprende cadenas pesadas, dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula huésped y permitir la expresión de dichas dos moléculas de ácido nucleico y recolectar dicho anticuerpo biespecífico del cultivo. Dichas primera y segunda moléculas de ácido nucleico pueden ser parte de la misma molécula de ácido nucleico, vector o vehículo de administración de genes y pueden

integrarse en el mismo sitio del genoma de la célula huésped. Alternativamente, dichas primera y segunda moléculas de ácido nucleico se proporcionan por separado a dicha célula.

Una realización preferida proporciona un método para producir un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención (a partir de una sola célula), en donde dicho anticuerpo biespecífico comprende dos dominios CH3 que son capaces de formar una interfaz, comprendiendo dicho método proporcionar:

- una célula que tiene a) una primera molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y que contiene un primer dominio CH3, y b) una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada que comprende una unión a antígeno sitio que se une a ErbB-3 y que contiene un segundo dominio CH3, en donde dichas moléculas de ácido nucleico están provistas de medios para el emparejamiento preferencial de dichos dominios CH3 primero y segundo,

dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula y permitir la expresión de dichas dos moléculas de ácido nucleico y recolectar dicho anticuerpo IgG biespecífico del cultivo. En una realización particularmente preferida, dicha célula también tiene una tercera molécula de ácido nucleico que codifica una cadena liviana común. Dicha primera, segunda y tercera molécula de ácido nucleico puede ser parte de la misma molécula de ácido nucleico, vector o vehículo de administración de genes y puede integrarse en el mismo sitio del genoma de la célula huésped. Alternativamente, dichas primera, segunda y tercera moléculas de ácido nucleico se proporcionan por separado a dicha célula. Una cadena liviana común preferida es 012, preferiblemente la cadena liviana kappa humana de línea germinal reordenada IgVk1 39*01/IGJk1*01, como se describió anteriormente. Los medios para el emparejamiento preferencial de dicho 1º y 2º dominio CH3 son preferiblemente las mutaciones correspondientes en el dominio CH3 de las regiones codificantes de la cadena pesada. Las mutaciones preferidas para producir esencialmente sólo anticuerpos biespecíficos son las sustituciones de aminoácidos L351K y T366K (numeración según Kabat) en el primer dominio CH3 y las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E en el segundo dominio CH3, o viceversa. Por lo tanto, se proporciona además un método de acuerdo con la invención para producir un anticuerpo biespecífico, en donde dicho primer dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351K y T366K (numeración según Kabat) y en donde dicho segundo dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E, dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula y permitir la expresión de dichas moléculas de ácido nucleico y recolectar dicho anticuerpo biespecífico del cultivo. También se proporciona un método de acuerdo con la invención para producir un anticuerpo biespecífico, en donde dicho primer dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E (numeración según Kabat) y en donde dicho segundo dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351K y T366K, dicho método que comprende además la etapa de cultivar dicha célula y permitir la expresión de dichas moléculas de ácido nucleico y recolectar dicho anticuerpo biespecífico del cultivo. Los anticuerpos que pueden producirse mediante estos métodos también forman parte de la presente invención. Los dominios de heterodimerización de CH3 son preferiblemente dominios de heterodimerización de IgG1. Las regiones constantes de cadena pesada que comprenden los dominios de heterodimerización de CH3 son preferiblemente regiones constantes de IgG1.

En una realización, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo de acuerdo con la invención. La molécula de ácido nucleico (típicamente un ácido nucleico in vitro, aislado o recombinante) codifica preferiblemente una región variable de cadena pesada como se muestra en la Figura 16A o Figura 16B o Figura 37, o una región variable de cadena pesada como se muestra en la Figura 16A o Figura 16B o Figura 37 que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, eliminaciones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia como se muestra en la Figura 16 o Figura 37. En otra realización preferida, la molécula de ácido nucleico codifica la misma secuencia de aminoácidos que el ácido nucleico representado en la Figura 16 o Figura 37, pero tiene una diferente secuencia porque codifica uno o más codones diferentes. Por ejemplo, dicha molécula de ácido nucleico tiene codones optimizados para células productoras de anticuerpos, como por ejemplo células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0 o células PER-C6™. La invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de la Figura 16D o la Figura 37.

Una molécula de ácido nucleico como se usa en la invención es típicamente, pero no exclusivamente, un ácido ribonucleico (ARN) o un ácido desoxirribonucleico (ADN). Los ácidos nucleicos alternativos están disponibles para un experto en la técnica. Un ácido nucleico de acuerdo con la invención está, por ejemplo, contenido en una célula. Cuando dicho ácido nucleico se expresa en dicha célula, dicha célula produce un anticuerpo de acuerdo con la invención. Por tanto, la invención en una realización proporciona una célula que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención y/o un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Dicha célula es preferiblemente una célula animal, más preferiblemente una célula de mamífero, más preferiblemente una célula de primate, lo más preferiblemente una célula humana. Para los fines de la invención, una célula adecuada es cualquier célula capaz de comprender y preferiblemente de producir un anticuerpo de acuerdo con la invención y/o un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

La invención proporciona además una célula que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención. Preferiblemente, dicha célula (típicamente una célula in vitro, aislada o recombinante) produce dicho anticuerpo. En una realización preferida, dicha célula es una célula de hibridoma, una célula CHO, una célula NS0 o una célula PER-C6™. En una realización particularmente preferida, dicha célula es una célula CHO. Se proporciona además un cultivo

celular que comprende una célula de acuerdo con la invención. Diversas instituciones y empresas han desarrollado líneas celulares para la producción a gran escala de anticuerpos, por ejemplo, para uso clínico. Ejemplos no limitantes de tales líneas celulares son las células CHO, células NS0 o células PER-C6™. Estas células también se utilizan para otros fines, como la producción de proteínas. Las líneas celulares desarrolladas para la producción a escala industrial de proteínas y anticuerpos se denominan en el presente documento líneas celulares industriales. Por tanto, en una realización preferida, la invención proporciona el uso de una línea celular desarrollada para la producción a gran escala de anticuerpos para la producción de un anticuerpo de la invención.

La invención proporciona además un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar una célula de la invención y recolectar dicho anticuerpo de dicho cultivo. Preferiblemente, dicha célula se cultiva en un medio sin suero. Preferiblemente, dicha célula está adaptada para el crecimiento en suspensión. Se proporciona además un anticuerpo que se puede obtener mediante un método para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el anticuerpo se purifica del medio del cultivo. Preferiblemente, dicho anticuerpo está purificado por afinidad.

Una célula de la invención es, por ejemplo, una línea celular de hibridoma, una célula CHO, una célula NS0 u otro tipo de célula conocido por su idoneidad para la producción de anticuerpos con fines clínicos. En una realización particularmente preferida, dicha célula es una célula humana. Preferiblemente una célula que se transforma mediante una región E1 de adenovirus o un equivalente funcional de la misma. Un ejemplo preferido de tal línea celular es la línea celular PER.C6™ o equivalente de la misma. En una realización particularmente preferida, dicha célula es una célula CHO o una variante de la misma. Preferiblemente, una variante que hace uso de un sistema de vector de glutamina sintetasa (GS) para la expresión de un anticuerpo.

La invención proporciona además una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención. La composición farmacéutica comprende preferiblemente un excipiente o vehículo (farmacéuticamente aceptable). En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende histidina 5-50 mM, trehalosa 100-300 mM, polisorbato20 0.1-0.3 g/l o una combinación de los mismos. El pH se ajusta preferiblemente a pH = 5.5-6.5. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende histidina 25 mM, trehalosa 220 mM, polisorbato20 0.2 g/l o una combinación de los mismos. El pH se ajusta preferiblemente a pH = 5.5-6.5, más preferiblemente a pH = 6.

Un anticuerpo de la invención preferiblemente comprende además un marcador, preferiblemente un marcador para la formación de imágenes in vivo. Normalmente, dicho marcador no es necesario para aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, en un entorno de diagnóstico, un marcador puede resultar útil. Por ejemplo, al visualizar células diana en el cuerpo. Son adecuados diversos marcadores y muchos son bien conocidos en la técnica. En una realización preferida, el marcador es un marcador radiactivo para la detección. En otra realización preferida, el marcador es un marcador de infrarrojo. Preferiblemente, el marcador de infrarrojo es adecuado para la formación de imágenes in vivo. El experto en la materia dispone de diversos marcadores de infrarrojo. Los marcadores de infrarrojo preferidos son, por ejemplo, IRDye 800; IRDye 680RD; IRDye 680LT; IRDye 750; IRDye 700DX; IRDye 800RS IRDye 650; Fosforamidita IRDye 700; IRDye 800 fosforamidita (LI-COR USA; 4647 Superior Street; Lincoln, Nebraska).

La invención proporciona además un método para el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 o en riesgo de tener dicho tumor que comprende administrar al sujeto un anticuerpo o un fármaco composición de acuerdo con la invención. Antes del inicio de dicho tratamiento, el método comprende preferiblemente determinar si dicho sujeto tiene, o está en riesgo de, tal tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3. En algunas realizaciones, el sujeto se clasifica como [+] o [++] para ErbB-2. En otra realización, el sujeto se clasifica como [+++] para ErbB-2. La invención proporciona además un anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3. Formulada de forma alternativa, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento o agente profiláctico para el tratamiento de un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3. Como se usa en el presente documento, el término tratamiento abarca la profilaxis.

El tumor es preferiblemente un cáncer positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3. Preferiblemente, dicho cáncer positivo es un cáncer de mama, como un cáncer de mama en estadio temprano. Sin embargo, la invención se puede aplicar a una amplia gama de cánceres positivos para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, como cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer gastroesofágico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas, sarcoma de células claras, cáncer de glándulas salivales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de piel, melanoma, y similares. Dicho anticuerpo de acuerdo con la presente invención es típicamente capaz de reducir una función de receptor inducida por ligando, preferiblemente crecimiento inducido por ligando, de ErbB-3 en una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3. Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferiblemente un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une al dominio III de ErbB-3. En una realización preferida, la afinidad (KD) de dicho segundo sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-3 positiva es igual o superior a la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-2 positiva. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3 para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o corre el riesgo de tener una ErbB-2, ErbB-3 o Tumor positivo para ErbB-2/ErbB-3, preferiblemente cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal,

cáncer de colon, cáncer gastroesofágico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, incluidas las células no pequeñas cáncer de pulmón, sarcoma de células claras, cáncer de glándulas salivales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de piel o melanoma, en donde la afinidad de dicho segundo sitio de unión al antígeno por un ErbB-3 célula positiva es igual o mayor que la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-2 positiva. La afinidad de dicho segundo sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-3 positiva es preferiblemente menor o igual a 2.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.39 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.99 nM. La afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula positiva para ErbB-2 es preferiblemente menor o igual a 5.0 nM, preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, preferiblemente menor o igual a 4.0 nM. En una realización preferida, dicho anticuerpo es el anticuerpo PB4188.

En una realización preferida, dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende un sitio de unión a antígeno que se une al menos a un aminoácido del dominio I de ErbB-2 seleccionado del grupo que consiste en T144, T164, R166, P172, G179, S180 y R181, y residuos de aminoácidos expuestos en la superficie que se encuentran dentro de aproximadamente 5 posiciones de aminoácidos de T144, T164, R166, P172, G179, S180 o R181.

En una realización preferida, dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferiblemente un sitio de unión a antígeno que se une al menos a un aminoácido del dominio III de ErbB-3 seleccionado del grupo que consiste en R426 y residuos de aminoácidos expuestos en la superficie que son ubicado dentro de 11.2 Å de R426 en la proteína ErbB-3 nativa.

Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3 para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, preferiblemente cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer gastroesofágico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón incluyendo el cáncer de pulmón de células pequeñas, sarcoma de células claras, cáncer de glándulas salivales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de piel o melanoma, en donde dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende un sitio de unión a antígeno que une al menos un aminoácido del dominio I de ErbB-2 seleccionado del grupo que consta de T144, T164, R166, P172, G179, S180 y R181, y residuos de aminoácidos expuestos a la superficie que se encuentran dentro de aproximadamente 5 posiciones de aminoácidos de T144, T164, R166, P172, G179, S180 o R181, y/o en donde dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferiblemente un sitio de unión al antígeno que se une al menos a un aminoácido del dominio III de ErbB-3 seleccionado del grupo que consiste en R426 y residuos de aminoácidos expuestos a la superficie que se encuentran dentro de 11.2 Å de R426 en la proteína ErbB-3 nativa.

El sujeto es preferiblemente un sujeto humano. El sujeto es preferiblemente un sujeto elegible para la terapia con anticuerpos monoclonales usando un anticuerpo específico de ErbB-2 tal como trastuzumab. En una realización preferida, el sujeto comprende un tumor, preferiblemente un cáncer positivo para ErbB-2/ErbB-3, preferiblemente un tumor/cáncer con un fenotipo resistente a la terapia ErbB-2 y/o un fenotipo resistente a la heregulina, preferiblemente un fenotipo resistente a anticuerpos monoclonales. Un tumor que involucra tal fenotipo puede escapar al tratamiento con un régimen anti-HER2 actual, como (pero no limitado a) la terapia con anticuerpos monoclonales contra ErbB-2.

La cantidad de anticuerpo de acuerdo con la invención que se administrará a un paciente está típicamente en la ventana terapéutica, lo que significa que se usa una cantidad suficiente para obtener un efecto terapéutico, mientras que la cantidad no excede un valor de umbral que conduce a un inaceptable alcance de los efectos secundarios. Cuanto menor sea la cantidad de anticuerpo necesaria para obtener un efecto terapéutico deseado, mayor será normalmente la ventana terapéutica. Por tanto, se prefiere un anticuerpo de acuerdo con la invención que ejerza suficientes efectos terapéuticos a dosis bajas. La dosis puede estar en el rango del régimen de dosificación de trastuzumab o menos.

La presente invención describe, entre otros, anticuerpos que se dirigen a los receptores ErbB-2 y ErbB-3 y dan como resultado una potente inhibición de la proliferación de líneas de células cancerosas in vitro e inhibición del crecimiento tumoral in vivo, incluso en presencia de un mecanismo de escape como, por ejemplo, sobreexpresión de NRG1-β1. Se identificó un panel diverso de brazos de unión de Fab humanos y murinos específicos para ErbB-2 o ErbB-3. Estos se produjeron como anticuerpos biespecíficos clonándolos en vectores de expresión complementarios que contienen mutaciones en la región CH3 que impulsa la heterodimerización de las cadenas pesadas. Se produjeron más de 500 anticuerpos biespecíficos a pequeña escala y se probaron en ensayos funcionales y de unión en tres líneas celulares de cáncer diferentes. Se seleccionaron y probaron varios anticuerpos biespecíficos en un modelo de xenoinjerto ortotópico usando la línea celular BxPC3. Esta línea celular expresa los receptores ErbB-2 y ErbB-3 y depende parcialmente del ligando ErbB-3 para su crecimiento. Los modelos BxPC3 son un modelo de cribado robusto y estricto. Además, se ha confirmado una fuerte actividad antitumoral in vivo usando un modelo de xenoinjerto usando la línea celular JIMT-1. Las células JIMT-1 se derivan de una metástasis pleural de una paciente de 62 años con cáncer de mama que era clínicamente resistente al trastuzumab. Las células JIMT-1 crecen como una monocapa adherente y forman tumores de xenoinjerto en ratones desnudos. Las células JIMT-1 tienen un oncógeno HER-2 amplificado, que no mostró mutaciones identificables en su secuencia codificante. Las células JIMT-1 sobreexpresan el ARNm y la

proteína de HER-2, y los niveles de ARNm y proteína de HER-1, HER-3 y HER-4 son similares a los de la línea celular SKBR-3 sensible a trastuzumab (Tanner et al, Mol Cancer Ther 2004).

Es importante destacar que se obtuvo un mejor efecto antitumoral usando un anticuerpo de acuerdo con la invención en comparación con los anticuerpos monoclonales trastuzumab y pertuzumab usados actualmente, así como con el compuesto químico lapatinib.

Los anticuerpos de la invención se pueden producir a niveles >50 mg/L después de la transfección transitoria en células 293F en suspensión. Los anticuerpos biespecíficos se pueden purificar hasta una pureza superior al 98% con rendimientos >70%. Los estudios de caracterización analítica muestran perfiles de anticuerpos IgG1 biespecíficos que son comparables a los de IgG1 monoespecífico bivalente. En términos de actividad funcional, un anticuerpo biespecífico de la invención puede demostrar una potencia superior en comparación con trastuzumab + pertuzumab in vitro e in vivo.

Las realizaciones preferidas de la invención proporcionan una terapia de combinación. En una realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención se combina con trastuzumab o pertuzumab, ya que estos anticuerpos se unen a diferentes epítomos ErbB-2 de modo que no compiten por el mismo epítopo con un anticuerpo de acuerdo con la invención, como se muestra en los Ejemplos. En otra realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención se combina con MM-121 (#Ab6) o RG7116 (Roche), ya que estos anticuerpos se unen a diferentes epítomos de ErbB-3 de manera que no compiten por el mismo epítopo con un anticuerpo de acuerdo con la invención, como se muestra en los Ejemplos.

En otra realización preferida, un compuesto de unión que es específico para ErbB-2 y ErbB-3 se combina con un inhibidor de un componente de la ruta de PI3Quinasa y/o con un inhibidor de un componente de la ruta de MAPK, tal como, por ejemplo, con un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de PI3Ka, un inhibidor de Akt, un inhibidor de mTOR o un inhibidor de Src. En una realización, un compuesto de unión que es específico para ErbB-2 y ErbB-3 se combina con un fármaco disruptor de microtúbulos o con un inhibidor de una histona desacetilasa (HDAC). Sorprendentemente, los inventores han encontrado un efecto sinérgico cuando se utilizan estas combinaciones. Por lo tanto, se proporciona además un método para el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 o con riesgo de tener dicho tumor, comprendiendo el método administrar al sujeto:

- un compuesto aglutinante que es específico para ErbB-2 y ErbB-3, y

- uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de un componente de la ruta PI3Quinasa, un inhibidor de un componente de la ruta MAPK, un fármaco disruptor de microtúbulos y un inhibidor de una histona desacetilasa (HDAC). Dicho inhibidor comprende preferiblemente un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de PI3Ka, un inhibidor de Akt, un inhibidor de mTOR o un inhibidor de Src. Dicho inhibidor de tirosina quinasa es preferiblemente afatinib, lapatinib y/o neratinib. Dicho inhibidor de PI3Ka es preferiblemente BYL719. En una realización, dicho inhibidor de Akt es MK-2206. En una realización preferida, dicho inhibidor de mTOR es everolimus. En una realización preferida, dicho inhibidor de Src es saracatinib. En una realización preferida, dicho fármaco disruptor de microtúbulos es paclitaxel. En una realización preferida, dicho inhibidor de HDAC es vorinostat. En una realización preferida, dicho compuesto de unión que es específico para ErbB-2 y ErbB-3 es MM-111 (Merrimack Pharmaceuticals). En una realización preferida, dicho compuesto de unión que es específico para ErbB-2 y ErbB-3 es un anticuerpo biespecífico. En una realización preferida, dicho compuesto de unión que es específico para ErbB-2 y ErbB-3 es un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, se proporciona además un método para el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 o con riesgo de tener dicho tumor, comprendiendo el método administrar al sujeto:

- un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-3, y

- uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de un componente de la ruta PI3Quinasa, un inhibidor de un componente de la ruta MAPK, un fármaco que es disruptor de los microtúbulos y un inhibidor de HDAC.

También se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3 para su uso en el tratamiento de ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ ErbB-3 tumor positivo, en donde dicho tratamiento comprende administrar dicho anticuerpo biespecífico y al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de un componente de la ruta PI3Quinasa, un inhibidor de un componente de la ruta MAPK, un microtúbulo que es disruptor de fármaco y un inhibidor de HDAC a un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3. Preferiblemente, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que tiene un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une al dominio III de ErbB-3 se combina con uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de un componente de la ruta PI3Quinasa, un inhibidor de un componente de la ruta MAPK, un fármaco disruptor de microtúbulos y un inhibidor de HDAC. Dicho inhibidor comprende preferiblemente un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de PI3Ka, un inhibidor de Akt, un inhibidor de mTOR o un inhibidor de Src. Dicho inhibidor de tirosina quinasa es preferiblemente afatinib, lapatinib y/o

neratinib. Dicho inhibidor de PI3Ka es preferiblemente BYL719. En una realización, dicho inhibidor de Akt es MK-2206. En una realización preferida, dicho inhibidor de mTOR es everolimus. En una realización preferida, dicho inhibidor de Src es saracatinib. En una realización preferida, dicho fármaco disruptor de microtúbulos es paclitaxel. En una realización preferida, dicho inhibidor de HDAC es vorinostat.

- 5 Dicho tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 es preferiblemente cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer gastroesofágico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer, cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células no pequeñas, sarcoma de células claras, cáncer de glándulas salivales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de piel o melanoma. Lo más preferiblemente, dicho tumor es cáncer de mama. En una realización, dicho tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 tiene menos de 1.000.000 de receptores de superficie celular ErbB-2 por célula tumoral.

- 15 En una realización, un anticuerpo de acuerdo con la presente invención que se combina con uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de un componente de la ruta de la PI3quinasa, un inhibidor de un componente de la ruta de la MAPK, un fármaco disruptor de microtúbulos y un inhibidor de HDAC, preferiblemente con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de PI3Ka, un inhibidor de Akt, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de Src, vorinostat y paclitaxel, más preferiblemente con al menos uno compuesto seleccionado del grupo que consiste en afatinib, lapatinib, neratinib, BYL719, MK-2206, everolimus, saracatinib, vorinostat y paclitaxel, típicamente es capaz de reducir una función del receptor inducida por ligando, preferiblemente crecimiento inducido por ligando, de ErbB-3 en una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3.
- 20 Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferiblemente un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une al dominio III de ErbB-3. En una realización preferida, la afinidad (KD) de dicho segundo sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-3 positiva es igual o superior a la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-2 positiva. La afinidad de dicho segundo sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-3 positiva es preferiblemente menor o igual a 2.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.39 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.99 nM. La afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula positiva para ErbB-2 es preferiblemente menor o igual a 5.0 nM, preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, preferiblemente menor o igual a 4.0 nM.

- 30 En una realización preferida, un anticuerpo de acuerdo con la invención que se combina con uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de un componente de la ruta de la PI3Quinasa, un inhibidor de un componente de la ruta de la MAPK, un microtúbulo fármaco disruptor y un inhibidor de HDAC, preferiblemente con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de PI3Ka, un inhibidor de Akt, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de Src, vorinostat y paclitaxel, más preferiblemente con al menos uno compuesto seleccionado del grupo que consiste en afatinib, lapatinib, neratinib, BYL719, MK-2206, everolimus, saracatinib, vorinostat y paclitaxel, comprende un sitio de unión al antígeno que se une al menos a un aminoácido del dominio I de ErbB-2 seleccionado de grupo formado por T144, T164, R166, P172, G179, S180 y R181, y residuos de aminoácidos expuestos a la superficie que se encuentran dentro de aproximadamente 5 posiciones de aminoácidos de T144, T164, R166, P172, G179, S180 o R181.

- 40 En una realización preferida, un anticuerpo de acuerdo con la invención que se combina con uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de un componente de la ruta de la PI3quinasa, un inhibidor de un componente de la ruta de la MAPK, un microtúbulo fármaco disruptor y un inhibidor de HDAC, preferiblemente con al menos uno compuesto seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de PI3Ka, un inhibidor de Akt, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de Src, vorinostat y paclitaxel, más preferiblemente con al menos uno compuesto seleccionado del grupo que consiste en afatinib, lapatinib, neratinib, BYL719, MK-2206, everolimus, saracatinib, vorinostat y paclitaxel, comprende un sitio de unión al antígeno que se une al menos a un aminoácido del dominio III de ErbB-3 seleccionado entre grupo que consta de R426 y residuos de aminoácidos expuestos a la superficie que se encuentran dentro de 11.2 Å de R426 en la proteína ErbB-3 nativa.

- 50 Preferiblemente, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que comprende al menos la secuencia CDR3, preferiblemente al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-2 seleccionada del grupo que consiste en MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 y MF1898 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, y/o que comprenda al menos la secuencia CDR3, preferiblemente al menos la secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3, de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-3 seleccionada del grupo que consiste en MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o la Figura 16E o la Figura 37 se combinan con uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de un componente de la ruta PI3Quinasa, un inhibidor de un componente de la ruta MAPK, un microtúbulo que es disruptor de fármaco y un inhibidor de HDAC, preferiblemente con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de PI3Ka, un inhibidor de Akt, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de Src, vorinostat y paclitaxel, más preferiblemente con al menos un compuesto seleccionados del grupo que consiste en afatinib, lapatinib, neratinib, BYL719, MK-2206, everolimus, saracatinib, vorinostat y paclitaxel.

En una realización preferida, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que comprende:

- 5 - una secuencia de la región variable de la cadena pesada específica de ErbB-2 seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de la región variable de la cadena pesada de MF2926, MF2930, MF1849, MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 y MF1898 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, o que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada específica de ErbB-2 que en como máximo 15 aminoácidos, preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, más preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, de las secuencias de la región variable de la cadena pesada de MF2926, MF2930, MF1849, MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 o MF1898, y
- 10 - una secuencia de la región variable de la cadena pesada específica de ErbB-3 seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de la región variable de la cadena pesada de MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37, o que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada específica de ErbB-3 que difiere en como máximo 15 aminoácidos, preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, más preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, de las secuencias de la región variable de la cadena pesada de MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074, se combina con uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de un componente de la ruta PI3Quinasa, un inhibidor de un componente de la ruta MAPK, un fármaco disruptor de microtúbulos y un inhibidor de HDAC, preferiblemente con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de PI3Ka, un inhibidor de Akt, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de Src, vorinostat y paclitaxel, más preferiblemente con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en afatinib, lapatinib, neratinib, BYL719, MK-2206, everolimus, saracatinib, vorinostat y paclitaxel. En una
- 15 - una realización preferida, el anticuerpo PB4188 se combina con uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de un componente de la ruta PI3Quinasa, un inhibidor de un componente de la ruta MAPK, un fármaco disruptor de microtúbulos y un inhibidor de HDAC, preferiblemente con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de PI3Ka, un inhibidor de Akt, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de Src, vorinostat y paclitaxel, más preferiblemente con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en afatinib, lapatinib, neratinib, BYL719, MK-2206, everolimus, saracatinib, vorinostat y paclitaxel.

Las realizaciones preferidas de la invención proporcionan usos de anticuerpos de acuerdo con la invención en condiciones de estrés por heregulina. La heregulina es un factor de crecimiento que participa en el crecimiento de células tumorales positivas para ErbB-3. Normalmente, cuando las células tumorales expresan altos niveles de heregulina (denominado estrés por heregulina), las terapias actualmente conocidas como trastuzumab, pertuzumab y lapatinib ya no son capaces de inhibir el crecimiento tumoral. Este fenómeno se llama resistencia a la heregulina. Sin embargo, sorprendentemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención también es capaz de contrarrestar el crecimiento de células tumorales que expresan niveles elevados de heregulina. Como se usa en este documento, un nivel de expresión de heregulina se considera alto si una célula tiene un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos al menos el 90% o el 95% del nivel de expresión de heregulina de las células BXP3C3 o MCF7. Los niveles de expresión de heregulina se miden, por ejemplo, usando qPCR con ARN tumoral (como, por ejemplo, se describe en Shames et al. PLOS ONE, febrero de 2013, Vol.8, Issue 2, pp 1-10 y en Yonesaka et al., Sci.transl. Med., Vol.3, Issue 99 (2011); pp1-11), o usando métodos de detección de proteínas, como por ejemplo ELISA, preferiblemente usando muestras de sangre, plasma o suero (como por ejemplo descrito en Yonesaka et al., Sci.transl.Med., Vol. 3, Número 99 (2011); págs.1-11). Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, en donde dichas células de dicho tumor tienen un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% del nivel de expresión de heregulina de células BXP3C3 o MCF7. Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferiblemente un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2. También se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, en donde las células de dicho tumor tienen un nivel de expresión de heregulina que es al menos del 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% del nivel de expresión de heregulina de células BXP3C3 o MCF7, el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo o composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Una realización preferida proporciona el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, en donde las células de dicho tumor tienen un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% del nivel de expresión de heregulina de células BXP3C3 o MCF7. Dicho tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 es preferiblemente cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer gastroesofágico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de

hígado, cáncer de pulmón, cáncer que incluye cáncer de pulmón de células no pequeñas, sarcoma de células claras, cáncer de glándulas salivales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de piel o melanoma. Lo más preferiblemente, dicho tumor es cáncer de mama. Por tanto, se proporciona además un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer gastroesofágico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas, sarcoma de células claras, cáncer de glándulas salivales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de piel o melanoma, preferiblemente cáncer de mama, donde las células de dicho cáncer tienen un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% del nivel de expresión de heregulina de células BXP3 o MCF7. Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferiblemente un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2.

Los niveles altos de heregulina están presentes típicamente durante la formación de metástasis (es decir, la migración, invasión, crecimiento y/o diferenciación de células tumorales o células iniciadoras de tumores). Normalmente, las células iniciadoras de tumores se identifican basándose en marcadores de células madre como, por ejemplo, CD44, CD24, CD133 y/o ALDH1. Por lo tanto, estos procesos apenas se pueden contrarrestar con terapias actualmente conocidas como trastuzumab y pertuzumab. Dado que un anticuerpo de acuerdo con la invención es capaz de contrarrestar el crecimiento y/o la diferenciación de células tumorales o células iniciadoras de tumores que expresan niveles elevados de heregulina, dicho anticuerpo de acuerdo con la invención también es particularmente adecuado para contrarrestar la formación de metástasis. Por lo tanto, se proporciona además un método para contrarrestar la formación de una metástasis en un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, en donde dicha célula tumoral positiva para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 tiene un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% de la heregulina nivel de expresión de las células BXP3 o MCF7, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-3. También se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3 para su uso en el tratamiento o prevención de la formación de metástasis, en donde dicho ErbB-2, ErbB-3 o la célula tumoral positiva para ErbB-2/ErbB-3 tiene un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% del nivel de expresión de heregulina de células BXP3 o MCF7. Se proporciona además el uso de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la formación de metástasis, en donde dicha célula tumoral positiva para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 tiene un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% del nivel de expresión de heregulina de BXP3 o MCF7 células. Dicho tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 es preferiblemente cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer gastroesofágico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células no pequeñas, sarcoma de células claras, cáncer de glándulas salivales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de piel o melanoma. Lo más preferiblemente, dicho tumor es cáncer de mama. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3 para su uso en el tratamiento o prevención de la formación de metástasis del cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer gastroesofágico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas, sarcoma de células claras, cáncer de glándulas salivales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de piel o células de melanoma, preferiblemente células de cáncer de mama, en donde dichas células tienen un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% del nivel de expresión de heregulina de las células BXP3 o MCF7. Dicho anticuerpo de acuerdo con la presente invención es típicamente capaz de reducir una función de receptor inducida por ligando, preferiblemente crecimiento inducido por ligando, de ErbB-3 en una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3. Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferiblemente un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une al dominio III de ErbB-3. En una realización preferida, la afinidad (KD) de dicho segundo sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-3 positiva es igual o superior a la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-2 positiva. La afinidad de dicho segundo sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-3 positiva es preferiblemente menor o igual a 2.0 nM, más preferiblemente menor o igual a 1.39 nM, más preferiblemente menor o igual a 0.99 nM. La afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula positiva para ErbB-2 es preferiblemente menor o igual a 5.0 nM, preferiblemente menor o igual a 4.5 nM, preferiblemente menor o igual a 4.0 nM.

En una realización preferida, dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende un sitio de unión al antígeno que se une al menos a un aminoácido del dominio I de ErbB-2 seleccionado del grupo que consiste en T144, T164,

R166, P172, G179, S180 y R181, y residuos de aminoácidos expuestos en la superficie que se encuentran dentro de aproximadamente 5 posiciones de aminoácidos de T144, T164, R166, P172, G179, S180 o R181.

En una realización preferida, dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferiblemente un sitio de unión al antígeno que se une al menos a un aminoácido del dominio III de ErbB-3 seleccionado del grupo que consiste en R426 y residuos de aminoácidos expuestos en la superficie que se encuentran dentro de 11.2 Å de R426 en la proteína ErbB-3 nativa.

Una realización preferida proporciona un método de acuerdo con la invención para el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 en donde las células de dicho tumor tienen un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% del nivel de expresión de heregulina de células BXP3 o MCF7, o un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en dicho tratamiento, en donde dicho anticuerpo comprende al menos la secuencia CDR3, preferiblemente al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, o al menos la secuencia de la región variable de la cadena pesada, de una región variable de la cadena pesada específica de ErbB-2 seleccionada del grupo que consiste en MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 y MF1898 como se muestra en la Figura 16A o la Figura 16E.

Una realización preferida proporciona un método de acuerdo con la invención para el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 en donde las células de dicho tumor tienen un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% del nivel de expresión de heregulina de células BXP3 o MCF7, o un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en dicho tratamiento, en donde dicho anticuerpo comprende al menos la secuencia CDR3, preferiblemente al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, o al menos la secuencia de la región variable de la cadena pesada, de una región variable de la cadena pesada específica de ErbB-3 seleccionada del grupo que consiste en MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37. Una realización proporciona el anticuerpo PB4188 para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, en donde las células de dicho tumor tienen un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% del nivel de expresión de heregulina de Células BXP3 o MCF7.

Como ya se ha descrito, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son particularmente adecuados para tratar células tumorales positivas para ErbB-2 con menos de 1.000.000 de receptores ErbB-2 en su superficie celular. Los pacientes con estos tumores, que normalmente se clasifican como ErbB-2 [++] o ErbB-2 [+], incluyen pacientes con tumores primarios, así como pacientes con tumores positivos para ErbB-2 recidivos. Las terapias actualmente utilizadas como trastuzumab (Herceptin) y pertuzumab solo se prescriben a pacientes con células malignas Positivas para ErbB-2 que tienen más de 1.000.000 de receptores ErbB-2 en su superficie celular, que se clasifican como ErbB-2 [+++]. Por tanto, los pacientes que se clasifican como ErbB-2 [++] o ErbB-2 [+] se tratan preferiblemente con un anticuerpo según la presente invención. Por tanto, se proporciona además un método o anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención, en donde dicho sujeto tiene un tumor positivo para ErbB-2 o ErbB-2/ErbB-3 que tiene menos de 1.000.000 de receptores de superficie celular ErbB-2 por célula tumoral. Una realización preferida proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3 para su uso en el tratamiento o prevención de la formación de metástasis, en donde dicha célula tumoral positiva para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 tiene un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos el 90% o el 95% del nivel de expresión de heregulina de las células BXP3 o MCF7, y en donde dicha célula tumoral tiene menos de 1.000.000 de receptores de superficie celular ErbB-2.

En otra realización preferida, se usa un anticuerpo de acuerdo con la invención para contrarrestar un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 en un sujeto que tiene una función cardíaca deteriorada, o que está en riesgo de los mismos. Con una función cardíaca deteriorada se entiende que el sujeto tiene una función cardíaca, como por ejemplo la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF), que es inferior al 90%, preferiblemente inferior al 85% o inferior al 80%, preferiblemente inferior al 75% o inferior al 70%, en comparación con una función cardíaca saludable. Dicha función cardíaca sana es, por ejemplo, la función cardíaca media (como por ejemplo la LVEF media) de la población sana. Alternativamente, dicha función cardíaca sana es la función (tal como la LVEF) medida en un paciente antes del inicio de la terapia antitumoral con un anticuerpo de acuerdo con la invención.

La función cardíaca se controla, por ejemplo, mediante un examen físico del sujeto y mediante un examen de la LVEF, utilizando, por ejemplo, un ecocardiograma o una exploración MUGA.

ErbB-2 está implicado en el crecimiento, reparación y supervivencia de cardiomiocitos adultos como parte de una red de señalización que implica el complejo receptor de heregulina HER2:HER4. Como se describió anteriormente en el

presente documento, la cardiotoxicidad es un factor de riesgo conocido en las terapias dirigidas a ErbB-2 y la frecuencia de complicaciones aumenta cuando se usa trastuzumab junto con antraciclinas, lo que induce estrés cardíaco. Por ejemplo, la combinación de doxilociclina con trastuzumab induce efectos secundarios cardíacos graves. A pesar del creciente número de casos clínicos de disfunción cardíaca inducida por trastuzumab, se desconoce su mecanismo de acción. En vista de la cardiotoxicidad de las terapias actualmente conocidas contra los tumores positivos a ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, es especialmente ventajoso utilizar un anticuerpo de acuerdo con la invención. Como se muestra en los Ejemplos, ahora se han proporcionado anticuerpos que no afectan, o en un grado significativamente menor en comparación con trastuzumab y pertuzumab, la supervivencia de los cardiomiocitos. Esto proporciona una ventaja importante ya que se reduce la cardiotoxicidad. Esto ya es ventajoso para las personas que no padecen una función cardíaca deteriorada, y más aún para las personas que sí la padecen, como, por ejemplo, los sujetos que padecen insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), disfunción ventricular izquierda (LVD)) y/o una fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF) disminuida y/o sujetos que han tenido un infarto de miocardio. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, en donde dicho sujeto tiene una función que sea inferior al 90%, preferiblemente inferior al 85% o inferior al 80% o inferior al 75% o inferior al 70%, en comparación con una función cardíaca sana. Dicha función cardíaca incluye preferiblemente la LVEF. Dicho tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 es preferiblemente cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer gastroesofágico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer que incluye cáncer de pulmón de células no pequeñas, sarcoma de células claras, cáncer de glándulas salivales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de piel o melanoma. Lo más preferiblemente, dicho tumor es cáncer de mama. Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención comprende preferiblemente un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une al dominio III de ErbB-3. Una realización preferida proporciona un método de acuerdo con la invención para el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 en donde el sujeto tiene una función cardíaca inferior al 90%, preferiblemente inferior al 85%, preferiblemente inferior al 80%, preferiblemente inferior al 75% o inferior al 70%, en comparación con una función cardíaca sana, o un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en dicho tratamiento, en donde dicho anticuerpo comprende:

- al menos la secuencia de CDR3, preferiblemente al menos las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, o al menos la secuencia de la región variable de la cadena pesada, de una región variable de la cadena pesada específica de ErbB-2 seleccionada del grupo que consiste en MF2926, MF2930, MF1849; MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031, MF2889, MF2913, MF1847, MF3001, MF3003 y MF1898 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, o una secuencia de región variable de cadena pesada que difiere en como máximo 15 amino ácidos, preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, más preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, de la cadena pesada mencionada secuencias de regiones variables; y/o

- al menos la secuencia CDR3, preferiblemente al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, o al menos la secuencia de la región variable de la cadena pesada, de una región variable de la cadena pesada específica de ErbB-3 seleccionada del grupo que consiste en MF3178; MF3176; MF3163; MF3099; MF3307; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37, o una secuencia de región variable de cadena pesada que difiere en como máximo 15 aminoácidos, preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, más preferiblemente en como máximo 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, de las secuencias de la región variable de la cadena pesada enumeradas. En una realización preferida, dicho anticuerpo es PB4188.

En una realización, dicho anticuerpo biespecífico es para uso en el tratamiento de un sujeto bajo condiciones de estrés por heregulina, como se explica con más detalle en otra parte. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, en donde dicho sujeto tiene un tumor cardíaco función que es inferior al 90%, preferiblemente inferior al 85%, preferiblemente inferior al 80%, preferiblemente inferior al 75% o inferior al 70%, en comparación con una función cardíaca sana, y en donde dichas células de dicho tumor tienen una expresión de heregulina nivel que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% del nivel de expresión de heregulina de células BXP3 o MCF7. Dicha función cardíaca incluye preferiblemente la LVEF. También se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, en donde el sujeto tiene una función cardíaca inferior al 90%, preferiblemente inferior al 85%, preferiblemente inferior al 80%, preferiblemente inferior al 75%, preferiblemente inferior al 70%, en comparación con una función cardíaca sana, y donde las células de dicho tumor tienen un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% del nivel de expresión de heregulina de células BXP3 o MCF7, comprendiendo el método administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico o composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Una realización preferida proporciona el uso de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 en un sujeto que tiene una función cardíaca, preferiblemente una LVEF, que es inferior al 90%, preferiblemente inferior al

85%, preferiblemente inferior al 80%, preferiblemente inferior al 75% o inferior al 70%, en comparación con una función cardíaca sana, preferiblemente una LVEF sana, en donde las células de dicho tumor tiene un nivel de expresión de heregulina que es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% o 95% del nivel de expresión de heregulina de Células BXP3C o MCF7.

También se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ErbB-3 para su uso en el tratamiento o prevención de la formación de metástasis, en donde dicho sujeto tiene una función cardíaca que sea inferior al 90%, preferiblemente inferior al 85%, preferiblemente inferior al 80%, preferiblemente inferior al 75%, preferiblemente inferior al 70% en comparación con una función cardíaca sana. Se proporciona además un uso de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la formación de metástasis, en donde dicho sujeto tiene una función cardíaca inferior al 90%, preferiblemente inferior al 85%, preferiblemente inferior al 80%, preferiblemente inferior al 75%, preferiblemente inferior al 70% en comparación con una función cardíaca sana. Dicho tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 es preferiblemente cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer gastroesofágico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer que incluye cáncer de pulmón de células no pequeñas, sarcoma de células claras, cáncer de glándulas salivales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de piel o melanoma. Lo más preferiblemente, dicho tumor es cáncer de mama. Dicha función cardíaca incluye preferiblemente la LVEF. En una realización preferida, dicho anticuerpo es el anticuerpo PB4188.

En otra realización, se utilizan anticuerpos de acuerdo con la invención para contrarrestar la fosforilación de diversos factores de la ruta de supervivencia Akt (también denominada ruta de la PI3 quinasa) y la ruta de la quinasa MAP. Estas son vías de señalización proliferativas corriente abajo de HER3. Sorprendentemente, los inventores han logrado inhibir significativamente la fosforilación de la proteína ribosómica Akt, ERK1/2 y S6 (S6-RP) con un anticuerpo según la presente invención, mientras que trastuzumab y pertuzumab no tienen estos fuertes efectos antifosforilación. Es ventajoso contrarrestar la fosforilación de factores de las rutas proliferativas de PI3 quinasa y MAP quinasa, ya que esto contrarresta el crecimiento de una célula tumoral positiva para ErbB-3. Por lo tanto, se proporciona además un uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para contrarrestar, preferiblemente inhibir, la fosforilación de Akt, ERK1/2 y/o S6-RP. Es importante destacar que la fosforilación de Akt puede reducirse significativamente o incluso bloquearse completamente con un anticuerpo de la invención, tanto in vitro como in vivo, como se muestra en los Ejemplos. Por lo tanto, una realización preferida proporciona el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para contrarrestar, preferiblemente inhibir, la fosforilación de Akt. También se proporciona un uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para contrarrestar la formación de un complejo HER3-p85. Dado que la formación de un complejo HER3-p85 es la primera fase en la activación de Akt, es ventajoso contrarrestar la formación de dicho complejo HER3-p85. Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une al dominio III de ErbB-3. Dicho anticuerpo preferiblemente comprende un sitio de unión al antígeno que se une al menos a un aminoácido del dominio I de ErbB-2 seleccionado del grupo que consiste en T144, T164, R166, P172, G179, S180 y R181, y residuos de aminoácidos expuestos en la superficie, que se encuentran dentro de aproximadamente 5 posiciones de aminoácidos de T144, T164, R166, P172, G179, S180 o R181. Además, o alternativamente, dicho anticuerpo comprende preferiblemente un sitio de unión al antígeno que se une al menos a un aminoácido del dominio III de ErbB-3 seleccionado del grupo que consiste en F409 y R426 y residuos de aminoácidos expuestos a la superficie que se encuentran dentro de 11.2 Å de R426 en la proteína ErbB-3 nativa. En una realización, dicho anticuerpo comprende al menos una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3, o al menos una secuencia VH, como se muestra en la Figura 16 o Figura 37. En una realización, dicho anticuerpo es PB4188.

Con el propósito de claridad y una descripción concisa, las características se describen en este documento como parte de la misma o de realizaciones separadas, sin embargo, se apreciará que el alcance de la invención puede incluir realizaciones que tengan combinaciones de todas o algunas de las características descritas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Titulación de antígeno en HER2 monomérico de un panel de brazos de HER2 que también están presentes en anticuerpos biespecíficos HER2xHER3 activos en combinación con un brazo de PG3178. Todos los monoclonales HER2 del panel HER2xHER3 excepto PG3025 se probaron en un ELISA de titulación de antígeno HER2.

Figura 2: Actividad funcional de anticuerpos biespecíficos HER2 x HER3 en células BxPC3 con o sin estimulación de ligando. Las líneas punteadas representan la actividad de trastuzumab, el anticuerpo de referencia en este ensayo, con o sin estimulación del ligando.

Figura 3: Curvas de titulación de anticuerpos monoclonales HER2 y HER3 (panel superior) y anticuerpos biespecíficos HER2 x HER3 de los mismos (panel inferior) en el ensayo MCF-7.

Figura 4: Efecto del tratamiento con anticuerpos sobre el tamaño del tumor BxPC3-luc2 en el día 31 en un modelo murino ortotópico. BLI, crecimiento tumoral medido por bioluminiscencia.

Figura 5: Efecto del tratamiento con anticuerpos sobre el tamaño del tumor BxPC3-luc2 en el día 31 en un modelo murino ortotópico. BLI, crecimiento tumoral medido por bioluminiscencia.

- 5 Figura 6: Análisis FACS de un anticuerpo HER2xHER3 biespecífico y sus anticuerpos monoclonales parentales en células que expresan MCF-7 y BxPC3-luc2 HER2. MFI, intensidad de fluorescencia media.

Figura 7: Caracterización analítica por HP-SEC y CIEX-HPLC. PB4188 (panel superior), anticuerpo monoclonal parental anti-HER2 (panel central), IgG de referencia monoclonal anti-RSV (panel inferior).

- 10 Figura 8: Inhibición de la proliferación de células JIMT-1 en agar blando mediante una titulación en serie de anticuerpos.

Figura 9: Inhibición de la proliferación de células BT-474 (panel superior) y SKBR3 (panel inferior) en matrigel mediante una titulación en serie de anticuerpos.

Figura 10a: Proliferación inducida por HRG y ramificación/invasión de células SKBR-3 en matrigel.

- 15 Figura 10b: Inhibición de la proliferación y ramificación/invasión inducidas por HRG de células SKBR-3 en matrigel por PB4188 en contraste con los anticuerpos monoclonales parentales.

Figura 10c: inhibición de la proliferación inducida por HRG y la ramificación/invasión de células SKBR-3 en matrigel por PB4188 en contraste con los anticuerpos monoclonales anti-HER3.

Figura 10d: Inhibición de la proliferación y ramificación/invasión inducidas por HRG de células SKBR-3 en matrigel por PB4188 en contraste con combinaciones de anticuerpos monoclonales anti-HER3 con trastuzumab.

- 20 Figura 10e: Inhibición de la proliferación inducida por HRG y la ramificación/invasión de células SKBR-3 en matrigel por PB4188 y la combinación PB4188 más trastuzumab

Figura 11: Actividad inhibidora superior de PB4188 en células HER2⁺⁺⁺ N87 en presencia de 100 ng/ml de HRG.

Figura 12: Actividad ADCC de PB4188 y PB3448 en una titulación de dosis

- 25 Figura 13: Aumento de la actividad ADCC del anticuerpo biespecífico en comparación con los anticuerpos parentales monoclonales o una combinación de los mismos

Figura 14: Actividad ADCC de PB4188 afucosilado en comparación con trastuzumab en células que expresan HER2 baja (panel superior) y alta (panel inferior)

Figura 15: Actividad ADCC de PB4188 afucosilado en células SKBR-3 HER2⁺⁺⁺ en presencia de células indicadoras que expresan una variante de FcγR alta o baja.

- 30 Figura 16: Secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de cadenas VH, cadenas livianas comunes y cadenas pesadas de anticuerpos de la invención. Cuando en esta figura se indica una secuencia líder, ésta no es parte de la cadena VH o del anticuerpo, pero típicamente se escinde durante el procesamiento de la proteína en la célula que produce la proteína.

- 35 Figura 17: Efecto del tratamiento con anticuerpos sobre el tamaño del tumor en un modelo de xenoinjerto murino JIMT-1. Crecimiento del tumor medido mediante la medición del calibre del volumen del tumor de los diferentes grupos de tratamiento. Arriba, crecimiento tumoral durante 60 días; inhibición del crecimiento del tumor inferior (TGI) al final del período de tratamiento (29 días).

Figura 18: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de los diferentes grupos de tratamiento en el modelo de xenoinjerto murino JIMT-1.

- 40 Figura 19: Inhibición del crecimiento inducido por el ligando N87. La proliferación de N87 impulsada por HRG puede superarse en una amplia gama de HRG por PB4188 en contraste con el anticuerpo anti-HER3 parental. Los datos se muestran a una concentración de anticuerpos de 40 ng/ml.

- 45 Figura 20: Medidas de afinidad celular en estado estacionario de IgG HER2xHER3 (PB4188) marcado con ¹²⁵I hacia células BT-474 (arriba; tres ensayos independientes) y células SK-BR-3 (abajo; tres ensayos independientes). La unión no específica se determinó usando un exceso de 100 veces de HER2xHER3 no marcado.

Figura 21A: Mapeo de epítomos HER2. Los residuos críticos identificados se representan como esferas negras en la estructura cristalina de HER2, los residuos críticos secundarios identificados se representan como esferas grises (PDB ID #1S78).

- Figura 21B: a) Estructura cristalina de HER2 (PDB #1S78) que muestra residuos del epítipo PG3958 verificados como esferas gris claro y residuos circundantes (+/- cinco residuos de aminoácidos) como esferas gris oscuro. b) Superficie expuesta al disolvente de la región del epítipo que muestra residuos de epítipo verificados en gris y residuos circundantes (+/- cinco residuos) en negro. c) Vista detallada de la región del epítipo con residuos de epítipo verificados en gris claro y residuos circundantes (+/- cinco residuos) en gris oscuro. d) Secuencia de aminoácidos primaria de la región del epítipo de HER2 PG3958 que indica residuos de epítipo verificados (subrayado en gris), residuos circundantes (negro) y residuos distantes (cursiva gris, no mostrados en a, b y c). Las Figuras y los análisis se realizaron con Yasara (www.yasara.org).
- Figura 21C: a) Estructura cristalina de HER3 (PDB #4P59) que muestra el residuo del epítipo Arg 426 en esferas grises y todos los residuos expuestos en la superficie dentro de un radio de 11.2 Å de Arg 426 en esferas negras. b) Superficie expuesta al disolvente de la región del epítipo con Arg 426 y residuos distantes mostrados en gris y todos los residuos expuestos a la superficie dentro de un radio de 11.2 Å de Arg 426 mostrados en negro. c) Residuos en la región del epítipo Arg 426 en gris claro y residuos circundantes (todos marcados) en gris oscuro. Las Figuras y los análisis se realizaron con Yasara (www.yasara.org).
- Figura 22: Confirmación de residuos de unión críticos para el brazo 3958 de Fab a HER2. El trastuzumab se incluyó como anticuerpo de control. La unión se determinó en una titulación FACS y la unión se expresa como AUC en comparación con la unión de trastuzumab. D143Y no se considera parte del epítipo 3958 ya que la unión de Trastuzumab a este mutante también está bloqueada.
- Figura 23: Residuos críticos para la unión de PG3178 representados en la estructura cristalina de HER3. Los residuos críticos identificados para la unión de PG3178 se representan como esferas negras en la estructura cristalina de HER3 (PDB ID #4P59).
- Figura 24: Confirmación de R426 como residuo de unión crítico para PG3175 a HER3. Se incluyeron dos anticuerpos anti-HER3 como anticuerpos de control. La unión se determinó en una titulación FACS y la unión se expresa como AUC en comparación con la unión a WT HER3.
- Figura 25: Ausencia de toxicidad por PB4188 bajo estrés cardíaco in vitro. Incubación de cardiomiocitos con PB4188 o anticuerpos de referencia monoespecíficos en presencia de 3 µM de antraciclina doxorubicina. La viabilidad de los cardiomiocitos se determinó mediante cuantificación de ATP y se expresó en unidades de luz relativas (RLU). T, trastuzumab; P, pertuzumab.
- Figura 26: Unión de PB4188 en comparación con trastuzumab y un anticuerpo HER3 a células amplificadas con HER2. Las valoraciones FACS se realizaron en las líneas celulares indicadas que expresan diferentes niveles de HER2. El área bajo la curva de la mediana de los valores de la señal de PE se trazó por línea celular.
- Figura 27: Unión de una titulación en serie de PB4188^{FITC} a células SKBR-3 preincubadas con una concentración saturada de PB4188, trastuzumab o un anticuerpo de control negativo. PB4188^{FITC} se une con la misma eficacia a SKBR-3 en presencia de trastuzumab o anticuerpo de control.
- Figura 28: Inhibición de la proliferación celular en condiciones de estrés de HRG por anticuerpos biespecíficos de HER2xHER3 compuestos por el mismo brazo Fab de HER3 y diferentes brazos de HER2 que se dirigen contra los cuatro dominios HER2.
- Figura 29: Combinación sinérgica de PB4188 con lapatinib sobre el crecimiento y morfología de las células SKBR-3. Izquierda, vistas microscópicas de células tratadas en diferentes condiciones; cambios morfológicos de la derecha representados gráficamente en relación con las condiciones de tratamiento.
- Figura 30A + B: inhibición de la fosforilación mediada por HRG de células N87 y SKBR-3 por PB4188 en un experimento de curso temporal. Se incluyeron como controles trastuzumab + pertuzumab y HRG solos.
- Figura 31: Inhibición de la fosforilación mediada por HRG de células N87 por PB4188 en un experimento de curso temporal. Se incluyeron como controles trastuzumab + pertuzumab y lapatinib.
- Figura 32: Se evaluaron los cambios en los niveles de Akt y la fosforilación de Akt 4 H después de una dosis de PB4188 de dos a cuatro semanas. Los niveles de fosforilación en lisados tumorales se evaluaron mediante ensayos Luminex. Los análisis se realizaron por duplicado y se analizaron cinco tumores por grupo.
- Figura 33: Efecto mediado in vivo de PB4188 sobre la señalización mediada por HER2:HER3 según se analiza mediante análisis Vera Tag sobre material tumoral JIMT-1. Los tumores se analizaron 4 horas después de la dosificación, los tumores derivados de animales tratados con PBS se incluyeron como controles.
- Figura 34: PB4188 reduce la progresión del ciclo celular. Las células sembradas en el medio de ensayo se incubaron con titulación de anticuerpos en presencia de una concentración estándar (1 ng/ml) o alta (100 ng/ml) de HRG. 24 h más tarde (o 48 h para las células MCF-7), se analizó la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo

celular (fases G0/G1, S o G2/M). El índice de proliferación se calculó como la relación entre el porcentaje de células en las fases S y G2/M y el porcentaje de células en la fase G0/G1. P+T, pertuzumab + trastuzumab.

Figura 35: Internalización de anticuerpos marcados con colorante sensible al pH en células cancerosas que sobreexpresan HER2. N87 (A, B) y SKBR-3 (C, D) sembrados en medio de ensayo suplementado con 1 ng/ml de HRG se incubaron durante 24 horas con anticuerpos marcados con colorante 100 nM sensibles al pH. Después de la recolección, las células se tiñeron con anticuerpo secundario IgG antihumano marcado con APC para detectar anticuerpos unidos a la superficie celular. Las células se analizaron mediante FACS para determinar la fluorescencia en los canales PE (A, C) para determinar la internalización y los canales APC (B, D) para determinar la unión a la superficie de los anticuerpos.

Figura 36: Actividad ADCC de Trastuzumab versus Trastuzumab + Pertuzumab con células derivadas de dos donantes diferentes.

Figura 37: Alineamientos de aminoácidos y nucleótidos de las variantes de F3178. Se indican las regiones CDR.

Figura 38: Curvas de titulación de anticuerpos monoclonales HER3 en el ensayo N87 dependiente de HRG. PG6058, PG6061 y PG6065 son variantes de PG3178. PG1337 es un control negativo específico para el toxoide tetánico. Los datos se normalizaron a la proliferación basal con ligando presente en cada placa.

Figura 39: Perfiles CIEX-HPLC de anticuerpos monoclonales HER3. PG6058, PG6061 y PG6065 son variantes de PG3178. El punto isoelectrónico calculado (pI) de la región VH y el tiempo de retención (tR) del pico principal se dan para cada anticuerpo.

Figura 40: Isobogramas de combinación de fármacos in vitro con PB4188 en líneas celulares amplificadas con HER2 a concentraciones de estrés de HRG (A) o cultivadas en matrigel (B).

Ejemplos

Métodos, materiales y detección de anticuerpos

Líneas celulares:

Las líneas celulares BxPC-3-luc2 (Perkin Elmer 125058), N87 (ATCC® CRL-5822™), SK-BR-3 (ATCC® HTB-30™), BT-474 (ATCC® HTB-20™), JIMT-1 (DSMZ ACC 589), L929 (Sigma Aldrich 85011425), K562 (DSMZ ACC10), HEK293T (ATCC® CRL-11268™), CHO-K1 (DSMZ ACC110), MCF-7 (DSMZ ACC 115), MDA-MB-468 (#300279-513, Cell Line Services) SK-OV-3 (ATCC® HTB-77™), MDA-MB-175 (ATCC-HTB-25), MDA-MB-453 (ATCC- HTB-131), MDA-MB-361 (ATCC-HTB-27), ZR-75-1 (ATCC-CRL-1500) y MKN-45 (DSMZ ACC409) se compraron de ATCC, DSMZ o Sigma Aldrich y se mantuvieron rutinariamente en medio de crecimiento suplementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 10%. Se obtuvieron células HEK293F Freestyle de Invitrogen y se mantuvieron de forma rutinaria en medio 293 FreeStyle.

Generación de vectores de dominio recombinante humano, de pollo, de rata y de dominio intercambiado (clonación de HER)

HER2 humano. Se amplificó HER2 humano de longitud completa mediante PCR a partir de ADNc derivado de ARN aislado de la línea celular de cáncer de mama JIMT-1. Los cebadores usados para la amplificación de HER2 humano fueron los siguientes. Cebador directo: AAGCTGGCTAGCACCATGGAGCTGGCGGCCTTGTC Cebador inverso: AATAATTCTAGACTGGCACGTCCAGACCCAGG. El producto amplificado de longitud completa se digirió con NheI y XbaI y posteriormente se clonó en los sitios correspondientes de pcDNA3.1 (Invitrogen).

La secuencia se verificó mediante comparación con la secuencia de referencia NCBI NM_004448.2. Para generar constructos que expresan únicamente el dominio extracelular (ECD) de HER2 humano con fines de transfección e inmunización, el dominio transmembrana de HER2 y el ECD se amplificaron por PCR y se volvieron a clonar en pVax1. Para propósitos de transfección, se generó otro constructo en pDisplay amplificando el dominio ECD de HER2, en este constructo, el dominio ECD de HER2 se fusiona con el dominio transmembrana de PDGFR.

HER3 humano. El clon de ADNc humano de longitud completa de HER3 se obtuvo de Origene. Para generar constructos que expresan únicamente el ECD de HER3 humano con fines de transfección e inmunización, el dominio transmembrana de HER3 y el ECD se amplificaron por PCR y se reclonaron en pVax1. Además, se generó otro constructo en pVax1 mediante la cual el dominio ECD de HER3 se fusionó con el dominio transmembrana de PDGFR. Todas las secuencias se verificaron por comparación con la referencia NCBI NM_001982.3.

El dominio extracelular de Cynomolgus HER2 se amplificó por PCR a partir de ADNc de cynomolgus - Tejido de colon normal de mono) (Biochain). Los cebadores utilizados para la amplificación de cynomolgus HER2 fueron los siguientes:

Cebador de avance: AAGCTGGCTAGCACCATGGAGCTGGCGGCCTGGTAC Cebador inverso: AATAATTCTAGACTGGCACGTCCAGACCCAGG El producto amplificado de longitud completa se digirió con NheI-

XbaI y posteriormente se clonó en los sitios correspondientes de pcDNA3.1. El clon se secuenció y se alineó con secuencias disponibles de monos rhesus (XM_002800451) para comprobar la corrección del clon ErbB-2.

El dominio extracelular de Cynomolgus HER3 se amplificó por PCR a partir de ADNc de cynomolgus - Tejido de colon normal de mono (Biochain). Los cebadores utilizados para la amplificación de cynomolgus HER3 fueron los siguientes:

5 Cebador directo: AAGCTGGCTAGCACCATGAGGGCGAACGGCGCTCTG, cebador inverso: AATAATTCTAGATTACGTTCTCTGGGCATTAGC El producto amplificado de longitud completa se digirió con NheI-XbaI y posteriormente se clonó en los sitios correspondientes de pcDNA3.1. El clon se secuenció y alineó con secuencias disponibles de monos rhesus (ENSMMUP00000027321) para comprobar la corrección del clon HER3.

10 La secuencia de HER2 de pollo se basó en la secuencia de referencia NM_001044661.1. Se generaron constructos de dominios intercambiados quiméricos intercambiando los dominios I hasta IV de la secuencia de HER2 de pollo por los dominios I humanos I hasta IV. Las secuencias que contienen un marcador myc se optimizaron para la expresión en células de mamíferos y se sintetizaron en Geneart.

15 La secuencia de HER3 de rata se basó en la secuencia de referencia NM_001044661.1. Se generaron constructos de dominios intercambiados quiméricos intercambiando los dominios I hasta IV de la secuencia de HER3 de rata por los dominios I humanos I hasta IV. Las secuencias que contienen un marcador m y c se optimizaron para la expresión en células de mamíferos y se sintetizaron en Geneart.

Generación de líneas celulares que sobreexpresan HER2 y HER3

20 Para generar líneas celulares que expresan altos niveles de HER3 en la superficie celular, se generó un vector de expresión de mamífero escindiendo el HER3 de longitud completa mediante digestión con NotI y KpnI. Posteriormente se clonó el fragmento en los sitios correspondientes del vector pcDNA3.1 (-)/hygro. Se utilizó un vector de expresión de HER2 y HER3 de longitud completa que codifica un gen de resistencia a la neomicina para generar líneas celulares que expresan altos niveles de HER2 en la superficie celular. Antes de la transfección, los plásmidos se linealizaron mediante digestión con SspI y FspI. Ambos vectores se transfectaron por separado en células K562 y se generaron conjuntos estables después de la selección de antibióticos. Las líneas celulares resultantes (K562-HER2 y K562-HER3) expresaron altos niveles de HER2 y HER3 en su superficie celular.

Inmunizaciones

30 Inmunizaciones de HER2. Se aplicaron cuatro estrategias de inmunización diferentes. Para la cohorte #A, se inmunizaron seis ratones C57B1/6 con 2×10^6 células L929 transfectadas transitoriamente con HER2 en 200 μ l mediante inyección intraperitoneal. Posteriormente, se reforzaron los ratones con 20 μ g de proteína Erbb-2-Fc (sistemas RND) disuelta en 125 μ l de Titermax Gold mediante inyección intraperitoneal el día 14, seguido de dosis de refuerzo con 2×10^6 células L929 transfectadas transitoriamente con HER2 en 200 μ l los días 28 y 42. Para la cohorte #C, se inmunizaron seis ratones C57B1/6 con 2×10^6 células L929 transfectadas transitoriamente con HER2 mediante inyección intraperitoneal. Posteriormente, los ratones se reforzaron con 2×10^6 células L929 transfectadas transitoriamente con HER2 en 200 μ l mediante inyección intraperitoneal el día 14, seguido de un refuerzo proteico con 20 μ g de proteína Erbb-2-Fc disuelta en 125 μ l de Titermax Gold mediante inyección intraperitoneal el día 35 y un refuerzo final con 20 μ g de proteína Erbb-2-Fc disuelta en 200 μ l de PBS mediante inyección intraperitoneal el día 49. Para la cohorte #E, se inmunizaron seis ratones C57B1/6 con 20 μ g de proteína Erbb-2-Fc disuelta en 125 μ l Titermax Gold mediante inyección intraperitoneal. Posteriormente, se realizaron refuerzos de proteínas con 20 μ g de proteína Erbb-2-Fc disueltos en 125 μ l de Titermax Gold mediante inyección intraperitoneal los días 14 y 28 y un refuerzo final con 20 μ g de proteína Erbb-2-Fc disueltos en 200 μ l de PBS mediante inyección intraperitoneal el día 42. Para la cohorte #G, se inmunizaron seis ratones C57B1/6 mediante vacunación con ADN en Genovac (Freiburg, Alemania) de acuerdo con sus protocolos. Los vectores proporcionados libres de endotoxina utilizados para la vacunación con ADN codificaron la parte transmembrana y extracelular de HER2 clonado en pVax1. Posteriormente, se administraron refuerzos de ADN los días 14, 28 y 66.

45 Inmunizaciones contra HER3. Se aplicaron cuatro estrategias de inmunización diferentes. Para la cohorte #B, se inmunizaron seis ratones (C57B1/6) con 2×10^6 células L929 transfectadas transitoriamente con HER3 en 200 μ l mediante inyección intraperitoneal. Posteriormente, los ratones fueron reforzados con 2×10^6 células L929 transfectadas transitoriamente con HER3 en 200 μ l los días 14, 28, 49 y 63. Para la cohorte #D, seis ratones C57B1/6 fueron inmunizados con 2×10^6 células L929 transfectadas transitoriamente con HER3 ruta inyección intraperitoneal los días 0, 14 y 28. Posteriormente, los ratones se reforzaron con 20 μ g de proteína Erbb-3-Fc disuelta en 125 μ l de Titermax Gold mediante inyección intraperitoneal el día 49 y una dosis de refuerzo final con 20 μ g de proteína Erbb-3-Fc disuelta en 200 μ l de PBS mediante inyección intraperitoneal el día 66. Para la cohorte #F, se inmunizaron seis ratones C57B1/6 con 20 μ g de proteína Erbb-3-Fc disuelta en 125 μ l de Titermax Gold mediante inyección intraperitoneal. Posteriormente, los ratones se reforzaron con 20 μ g de proteína Erbb-3-Fc disuelta en 125 μ l de Titermax Gold mediante inyección intraperitoneal los días 14 y 28 y se dio un refuerzo final con 20 μ g de proteína Erbb-3-Fc disuelta en 200 μ l de PBS por ruta inyección intraperitoneal el día 42. Para la cohorte #H, se inmunizaron seis ratones C57B1/6 mediante vacunación con ADN en Genovac (Freiburg, Alemania) de acuerdo con sus protocolos. Los vectores proporcionados libres de endotoxina utilizados para la vacunación con ADN codificaron la transmembrana

de PDGFR y la parte extracelular de HER3 clonada en pVax1. Posteriormente, se administraron refuerzos de ADN los días 14, 28 y 66.

Determinación de títulos de anticuerpos.

5 Se determinaron los títulos de anti-HER2 en el suero de ratones C57B1/6 inmunizados mediante ELISA contra la proteína ECD-ErbB-2 (Bendermedsystems) y análisis FACS en el K562 negativo para HER2, la línea celular de baja expresión de HER2 MCF-7 y HER2 células SKBR-3 y BT-474 amplificadas. Los títulos de anti-HER3 en el suero de ratones C57B1/6 inmunizados se determinaron mediante ELISA contra la proteína ErbB-3-Fc y análisis FACS en el K562 negativo para HER3, la línea celular HER2 de baja expresión MCF-7 y HER2 amplificaron células SKBR-3 y BT-474.

10 Los títulos en suero contra HER2 y HER3 antes de sacrificar los animales se describen en la Tabla 1 y la Tabla 2, respectivamente. Los animales de todas las cohortes desarrollaron respuestas de anticuerpos contra HER2 o HER3.

Recuperación de tejido linfóide.

15 Se extrajeron el bazo y los ganglios linfáticos de drenaje de todos los ratones vacunados con ADN (cohortes #G y #H). Se generaron suspensiones de células individuales a partir de todos los tejidos y, posteriormente, los tejidos se lisaron en reactivo Trizol. De las cohortes #A hasta #F se extrajeron los bazos de todos los ratones excepto un ratón de la cohorte #C que murió después del primer refuerzo. Se generaron suspensiones de células individuales a partir de todos los bazos y la fracción total de células B se aisló utilizando el procedimiento de separación MACS, ya sea por enriquecimiento de CD19 (cohortes # A, E, F) o por agotamiento de células no B (cohortes # B, C, D).

Generación de bibliotecas de presentación de fagos de ratones inmunizados

20 Se construyó una biblioteca de fagos para cada ratón. Con este fin, se usó el material de todos los ratones por grupo (5 o 6 ratones por grupo) para preparar bibliotecas de fagos usando el siguiente enfoque. De cada ratón individual se aisló ARN y se sintetizó ADNc y se realizaron PCR específicas de la familia VH. Posteriormente, se purificaron todos los productos de PCR de la familia VH por ratón y se determinó la concentración de ADN, se digirió y se ligó en un vector de presentación de fagos que contenía la cadena liviana común para generar una biblioteca de fagos quiméricos de ratón y humanos. Todas las bibliotecas de fagos contenían >106 clones con una frecuencia de inserción de >85%.

Selección de fagos que portan fragmentos Fab que se unen específicamente a HER2 y HER3

Los fragmentos de anticuerpos se seleccionaron usando bibliotecas de presentación de fagos de anticuerpos. Para las selecciones se utilizaron bibliotecas inmunizadas y bibliotecas sintéticas (como se describe en de Kruif et al. Mol. Biol. (1995), 248, 97-105).

30 Selección y cribado del fago HER2

Se rescataron bibliotecas de fagos con el fago auxiliar VCS-M13 (Stratagene) y se seleccionaron para dos rondas en proteína recombinante recubierta con inmunotubos (Nunc). En la primera ronda, se recubrió con inmunotubos ErbB-2-Fc (Bendermedsystems), mientras que en la segunda ronda se recubrió con los inmunotubos ErbB-2-Fc (sistemas RND). Los inmunotubos se bloquearon con leche en polvo desnatada al 4% (ELK). Las bibliotecas de anticuerpos de fagos también se bloquearon con ELK al 4% antes de la adición de la biblioteca de fagos a los inmunotubos. La incubación con la biblioteca de fagos con la proteína recubierta en los tubos inmunitarios se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente en condiciones de rotación. A continuación, se lavaron los inmunotubos de cinco a diez veces con Tween-20 al 0.05% en PBS seguido de 5 a 10 veces en PBS. Los fagos unidos se eluyeron usando glicina 50 mM (pH 2.2) y se añadieron a E. coli XL-1 Blue y se incubaron a 37°C para la infección por fagos. Posteriormente, las bacterias infectadas se sembraron en placas de agar que contenían ampicilina, tetraciclina y glucosa y se incubaron a 37°C durante la noche. Después de la primera ronda, se rasparon las colonias de las placas y se combinaron y posteriormente se rescataron y amplificaron para preparar una biblioteca de primera ronda enriquecida. A continuación, la biblioteca enriquecida se seleccionó en ErbB-2-Fc (sistemas RND) utilizando el protocolo descrito anteriormente. Después de la segunda ronda de selección, los clones individuales se recogieron y se rescataron para preparar una minipreparación monoclonal de fagos. Los clones de fagos positivos que se unen a ErbB2 se identificaron luego en FACS para unirse a la línea celular de cáncer de mama BT-474. Se secuenciaron los genes VH de todos los clones específicos de ErbB2. Los reordenamientos del gen VH se establecieron con el software VBASE2 para identificar clones únicos. A continuación, todos los clones únicos se ensayaron en formato de fagos para la unión en FACS a células HEK293T (control negativo), células HEK293T transfectadas transitoriamente con células ErbB-2 y BT-474.

Selección y cribado del fago HER3

Se rescataron bibliotecas de fagos con el fago auxiliar VCS-M13 (Stratagene) y se seleccionaron para dos rondas en inmunotubos (Nunc) recubiertos con proteína recombinante. En ambas rondas de selección, se recubrió con ErbB-3-Fc (sistemas RND) los inmunotubos. Para superar un sesgo de selección hacia la parte Fc de la proteína de fusión, se realizaron ambas rondas de selección en ErbB-3-Fc en presencia de 150 µg/ml de IgG humana. Los inmunotubos

- se bloquearon con ELK al 4%. Las bibliotecas de anticuerpos de fagos se bloquearon con ELK al 4% antes de la adición de la biblioteca de fagos a los inmunotubos. La incubación con la biblioteca de fagos se realizó durante 2 h en condiciones de rotación. A continuación, se lavaron los inmunotubos de cinco a diez veces con Tween-20 al 0.05% en PBS seguido de 5 a 10 veces en PBS. Los fagos unidos se eluyeron usando glicina 50 mM (pH 2.2) y se añadieron a *E. coli* XL-1 Blue y se incubaron para la infección por fagos. Posteriormente, las bacterias infectadas se sembraron en placas de agar que contenían ampicilina, tetraciclina y glucosa y se incubaron a 37°C durante la noche. Después de la primera ronda, se rasparon las colonias de las placas y se combinaron y los fagos se rescataron y amplificaron para preparar una biblioteca de primera ronda enriquecida. A continuación, se seleccionó la biblioteca enriquecida en Erbb-3-Fc (sistemas RND) usando el protocolo descrito anteriormente. Después de la segunda ronda de selección, los clones individuales se recogieron y se rescataron para preparar una minipreparación monoclonal de fagos. Se identificaron clones de fagos positivos en FACS para unirse a la línea celular de cáncer de mama BT-474. Se secuenciaron los genes VH de todos los clones positivos. Los reordenamientos del gen VH se establecieron con el software VBASE2 para identificar clones únicos. Todos los clones únicos se probaron en formato de fagos para la unión en FACS a células K562 (control negativo), células K562-HER3 estables y células BT-474.
- En total, se realizaron 36 selecciones en formatos de antígeno Erbb2 y Erbb3. Todos los procedimientos de cribado de selección dieron como resultado 89 clones Fab únicos dirigidos contra HER2 y 137 clones Fab únicos dirigidos contra HER3. Un Fab se consideró único en función de su secuencia HCDR3 única, una indicación de un evento de recombinación de VDJ único. En algunos casos se obtuvieron variantes clonales, con un HCDR3 idéntico, pero diferencias en el CDR1 y/o CDR2. De las bibliotecas de ratones inmunizados se seleccionaron agrupaciones de variantes clonales que contenían sustituciones en el gen VH que reflejaban variantes de afinidad.

Selección/caracterización de anticuerpos

Generación de anticuerpos monoclonales

- Se clonaron genes VH de anticuerpos únicos, a juzgar por la secuencia del gen VH y algunas variantes de secuencia de los mismos, derivados de las bibliotecas de fagos de ratón inmunizados en el vector de la estructura principal de IgG1. Se utilizaron dos líneas celulares de producción diferentes durante el proceso; células HEK293T y 293F Freestyle. Se cultivaron células HEK293T adherentes en placas de 6 pozos hasta una confluencia del 80%. Las células se transfectaron transitoriamente con la mezcla de ADN-FUGENE individual y se cultivaron adicionalmente. Siete días después de la transfección, se recogió el sobrenadante y se renovó el medio. Catorce días después de la transfección, se combinaron los sobrenadantes y se filtraron a través de 0.22 µm (Sartorius). El sobrenadante estéril se almacenó a 4°C. Se cultivaron células 293F Freestyle adaptadas a la suspensión en matraces T125 en una meseta de agitación hasta una densidad de 3.0×10^6 células/ml. Las células se sembraron a una densidad de $0.3-0.5 \times 10^6$ células viables/ml en cada pozo de una placa de 24 pozos de profundidad. Las células se transfectaron transitoriamente con la mezcla de ADN:PE1 estéril individual y se cultivaron adicionalmente. Siete días después de la transfección, se recogió el sobrenadante y se filtró a través de 0.22 µm (Sartorius). El sobrenadante estéril se almacenó a 4°C.

Generación de anticuerpos biespecíficos

Se generaron anticuerpos biespecíficos usando la tecnología patentada CH3 para asegurar una heterodimerización eficaz y la formación de un anticuerpo biespecífico. La tecnología CH3 utiliza mutaciones puntuales basadas en carga en la región CH3 para permitir el emparejamiento eficiente de dos moléculas de cadena pesada diferentes como se describió anteriormente (PCT/NL2013/050294; publicado como WO 2013/157954 A1).

Purificación de IgG para cribado funcional

- La purificación de IgG se realizó a pequeña escala (<500 µg), mediana (<10 mg) y gran escala (>10 mg) usando cromatografía de afinidad. Se realizaron purificaciones a pequeña escala en condiciones estériles en placas de filtro de 24 pozos usando filtración al vacío. Primero se ajustó el pH del medio a pH 8.0 y posteriormente se incubaron las producciones a pequeña escala con perlas de proteína A Sepharose CL-4B (50% v/v) (Pierce) durante 2 h a 25°C en una plataforma de agitación a 600 rpm (agitador de placas Heidolph). A continuación, las perlas se recogieron mediante filtración al vacío. Las perlas se lavaron dos veces con PBS pH 7.4. La IgG se eluyó a pH 3.0 con regulador citrato 0.1 M y la fracción de IgG se neutralizó inmediatamente con Tris pH 8.0. El intercambio de regulador se realizó mediante centrifugación usando multiplacas Ultracel 10 multipantalla (Millipore). Las muestras terminaron en un regulador final de PBS pH 7.4.

Validación de IgG específicas de HER2/HER3

- Se ensayó la unión de anticuerpos en FACS a BT-474, HEK293T y HEK293T que sobreexpresan HER2 o HER3. Por lo tanto, las células se recolectaron usando tripsina y se diluyeron a 10^6 células/ml en regulador FACS (PBS/BSA al 0.5%/EDTA 0.5 mM). Se añadieron $1-2 \times 10^5$ células a cada pozo en una placa de 96 pozos con fondo en U. Las células se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g a 4°C. El sobrenadante se descartó invirtiendo la(s) placa(s). Se añadieron 50 µl de cada muestra de IgG a una concentración de 10 µg/ml y se incubaron durante 1 hora en hielo. Las células se centrifugaron una vez, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con regulador FACS. Se añadieron 50 µl de PE anti-IgG humana de ratón diluida 1:100 (Invitrogen) y se incubaron durante 30-60 minutos en hielo en la oscuridad. Después de añadir regulador FACS, las células se centrifugaron una vez, se eliminó el

sobrenadante y las células se lavaron dos veces con regulador FACS. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto en un entorno HTS. La unión de los anticuerpos a las células se evaluó mediante la intensidad de fluorescencia media (MFI).

- 5 Para probar la reactividad de unión no específica, se usaron ensayos ELISA. Se analizó la reactividad de los anticuerpos HER2 y HER3 frente a los antígenos fibrinógeno, hemoglobulina y toxina tetánica. Para probar la unión específica a HER2 y HER3, los anticuerpos se probaron para determinar la unión a dominios extracelulares recombinantes purificados de EGFR, HER2, HER3 y HER4. Los antígenos se recubrieron durante la noche en placas de ELISA MAXISORP™. Los pozos de las placas de ELISA se bloquearon con PBS (pH 7.2) que contenía BSA al 5% durante 1 hora a 37°C. Los anticuerpos seleccionados se ensayaron por duplicado a una concentración de 10 µg/ml diluidos en PBS-BSA al 2% y se dejaron unir durante 2 horas a 25°C. Como control, el procedimiento se realizó simultáneamente con un anticuerpo específico para los antígenos recubiertos y un anticuerpo de control negativo. Las placas de ELISA se lavaron 5 veces con PBS-T (PBS-Tween 20 al 0.05% v/v). Se detectó IgG unida con conjugado de HRP diluido 1:2000 (BD anti-ratón de cabra) y se dejó que se uniera durante 2 horas a 25°C. Las placas de ELISA se lavaron 5 veces con PBS-T (PBS-Tween 20 al 0.05%) y se detectó la IgG unida mediante la medición de la DO492nm.

Agrupación de epítomos de IgG específicas de HER2/HER3

El panel de anticuerpos anti-HER2 se clasificó en función de su reactividad con el ECD de HER2 derivado de otras especies (ratón, pollo) y de su unión a dominios específicos en la molécula de HER2, es decir, los dominios I, II, III y IV usando constructos quiméricos.

- 20 El panel de anticuerpos anti-HER3 se clasificó en función de su reactividad con el ECD de HER3 derivado de otras especies (cyno, rata) y en su unión a dominios específicos en la molécula de HER3, es decir, los dominios I, II, III y IV usando constructos quiméricos.

25 Para este propósito, las células CHO-K1 se transfectaron transitoriamente con los constructos relevantes usando mezclas de lipofectamina/ADN. En el constructo de dominios intercambiados quiméricos, los dominios de HER2 de pollo o HER3 de rata se reemplazan por la contraparte humana. La unión de los anticuerpos específicos se midió mediante FACS. La expresión de los constructos se confirmó usando un anticuerpo anti-myc. La tinción FACS con trastuzumab se incluyó como control para la unión específica al dominio IV. Los anticuerpos de cada grupo podrían clasificarse en función de la intensidad de la tinción (MFI). El panel HER2 de 65 anticuerpos se pudo mapear en siete contenedores (Tabla 3).

- 30 1. Dominio I específico (25)
2. Dominio II específico (2)
3. Dominio III específico (23)
4. Dominio IV específico (7)
5. Dominio IV específico y reactivo cruzado al ratón (2)
35 6. Reactivo a todos los constructos (2)
7. Solo reactivo al HER2 humano (4)

Competencia con trastuzumab

40 Dos anticuerpos mapeados en el dominio IV de HER2 inhibieron la proliferación de células SKBR-3. Ambos anticuerpos compartían una CDR3 similar excepto por una diferencia de aminoácidos. Se investigó la capacidad de un anticuerpo, PG1849 para competir con trastuzumab en un ELISA de competición. En este ELISA se realizó recubrimiento con Fc-HER2 y se incubó con una concentración de 15 µg/ml de anticuerpo IgG. Después de una incubación de 15 minutos, los fagos se dejaron incubar durante otra hora. Posteriormente, se detectaron fagos. La Tabla 4 demuestra que PG1849 y trastuzumab podrían unirse simultáneamente a HER2 ya que no apareció pérdida de señal durante el ELISA. Sólo se observó verdadera competencia cuando se combinaron el mismo fago y anticuerpo en el ensayo.

45 El panel de HER3 de 124 anticuerpos podría mapearse en cinco contenedores (Tabla 5):

1. Alta reactividad de dominio III, reactividad de rata y ratón y reactividad menor al dominio IV (8)
2. Alta reactividad de dominio III, rata, humanos y cinoreactiva, reactividad menor al dominio IV (8)
3. Solo reactividad a HER3 de rata, cyno y humano (43)
50 4. Solo reactivo al HER3 humano (32)

5. Reactivo a todos los constructos (33)

Ensayos de proliferación de líneas celulares

Se cultivaron células SK-BR-3 en DMEM-F/12 suplementado con L-glutamina y FBS inactivado por calor al 10%. Se cultivaron células BxPC-3-luc2 en RPMI1640 suplementado con FBS inactivado por calor al 10%. Se cultivaron células MCF-7 en RPMI1640 suplementado con piruvato sódico NEAA1 mM 100 µM, insulina 4 µg/ml y FBS inactivado por calor al 10%.

Para el ensayo de proliferación de células SK-BR-3, los cultivos de células subconfluentes se lavaron con PBS, se tripsinizaron y la tripsina se inactivó añadiendo medio de cultivo. Las células se diluyeron a 6×10^4 células/ml en medio de cultivo. Los anticuerpos se diluyeron a concentraciones de 10 y 1 µg/ml y se añadieron en un volumen de 100 µl en placas de fondo negro de 96 pozos (ABgene AB-0932). Las células se agregaron a una densidad de 6000 células/pozo. Las células se cultivaron durante 3 días a 37°C, 5% de CO₂, en una humedad relativa del 95%. Se añadió Alamar Blue™ (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubó durante 6 horas a 37°C, 5% de CO₂, en un 95% de humedad relativa en la oscuridad. Se midió la fluorescencia a una excitación de 550 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. El grado de inhibición del crecimiento se comparó con el de la misma concentración de trastuzumab (Tabla 6).

Para el ensayo de proliferación de células MCF-7 y BxPC-3-luc2, los cultivos de células subconfluentes se lavaron con PBS, se tripsinizaron y la tripsina se inactivó añadiendo medio de cultivo. Las células se lavaron dos veces en grandes volúmenes de medio de ensayo (medio RPMI 1640 que contenía BSA al 0.05% y 10 µg/ml de holo transferrina). Las células MCF-7 se diluyeron hasta 5×10^4 células/ml en medio de cultivo. Los anticuerpos se diluyeron a concentraciones de 10 y 1 µg/ml y se añadieron en un volumen de 100 µl en placas de fondo negro de 96 pozos (ABgene AB-0932). Las células se añadieron a una densidad de 5000 células/pozo en presencia de una concentración final de 1 ng/ml de dominio humano recombinante humano NRG1-beta 1/HRG1-beta 1 EGF; (396-HB-050 RND). El Dominio EGF NRG1-beta 1/HRG1-beta 1 humano se denominará en lo sucesivo HRG. Las células se cultivaron durante 5 días a 37°C, 5% de CO₂, en un 95% de humedad relativa. Se añadió Alamar Blue™ (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubó durante 24 horas a 37°C, 5% de CO₂, en un 95% de humedad relativa en la oscuridad. Se midió la fluorescencia a una excitación de 550 nm con una longitud de onda de emisión de 590 nm. El grado de inhibición del crecimiento se comparó con el de la misma concentración de #Ab6 (Tabla 7).

Se usaron ensayos de proliferación de BxPC-3-luc-2 para seleccionar los anticuerpos biespecíficos. Las células BxPC-3-luc-2 se diluyeron a 8×10^4 células/ml en medio de cultivo. Los anticuerpos se diluyeron a concentraciones de 10 y 1 µg/ml y se añadieron en un volumen de 100 µl en placas de fondo negro de 96 pozos (ABgene AB-0932). Las células se añadieron a una densidad de 8000 células/pozo en ausencia o presencia de 10 ng/ml de concentración final humana HRG. Las células se cultivaron durante 4 días a 37°C, 5% de CO₂, en una humedad relativa del 95%. Se añadió Alamar Blue™ (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubó durante 4 horas a 37°C, 5% de CO₂, en un 95% de humedad relativa en la oscuridad. Se midió la fluorescencia a una excitación de 550 nm con una longitud de onda de emisión de 590 nm.

Para minimizar los efectos de borde, los pozos exteriores de las placas de 96 pozos se llenaron completamente con PBS.

Clasificación de afinidad de IgG específicas de HER2

Usamos el método descrito por Devash (PNAS, 1990) para clasificar los anticuerpos en un ELISA de antígeno limitado. El uso de concentraciones de recubrimiento de antígeno disminuidas elimina las reacciones de reactividad cruzada observadas y puede usarse para detectar anticuerpos de alta afinidad/avidez. Por tanto, la concentración de antígeno en el soporte sólido se redujo gradualmente para investigar las inmunoreactividades débiles. Una titulación en serie de la proteína ECD-ErbB-2 comenzando desde 2.5 µg/ml hasta 0.019 µg/ml se recubrió durante la noche a las placas de ELISA MAXISORP™. Los pozos de las placas de ELISA se bloquearon con PBS (pH 7.2) que contenía BSA al 5% durante 1 hora a 37°C. Los anticuerpos seleccionados se ensayaron por duplicado a una concentración de 10 µg/ml diluidos en PBS-BSA al 2% y se dejaron unir durante 2 horas a 25°C. Como control, el procedimiento se realizó simultáneamente con un anticuerpo específico para los antígenos recubiertos y un anticuerpo de control negativo. Las placas de ELISA se lavaron 5 veces con PBS-T (PBS-Tween 20 al 0.05% v/v). La IgG unida se detectó con conjugado de HRP diluido 1:2000 (IgG anti-ratón de cabra, BD Biosciences) y se dejó que se uniera durante 2 horas a 25°C. Las placas de ELISA se lavaron 5 veces con PBS-T (PBS-Tween 20 al 0.05%) y se detectó la IgG unida mediante la medición de la DO492nm. Se probaron PG1849, PG2916, PG2926, PG2930, PG2971, PG2973, PG3004 y PG3031 en un ELISA de titulación de antígeno HER2 (Figura 1).

Unión de genes VH de HER2 con varias cadenas livianas kappa

Para investigar la unión de HER2 VH derivadas de diferentes bibliotecas de presentación de fagos, se clonó un panel de anticuerpos HER2 y se expresó en el contexto de otra cadena kappa de VK, es decir, el VL de MEHD7945A. Las IgG producidas se sometieron a análisis FACS en células K562 y células K562-HER2 estables. Los genes VH derivados de las bibliotecas combinatorias y las bibliotecas no combinatorias se enumeran en la Tabla 8. Las cadenas VH MF2971, MF3958, MF2916, MF2973, MF3004, MF3025, MF3031, todas podrían combinarse con la cadena liviana

MEHD7945A sin perder una unión y especificidad antigénica significativa como se observa cuando se combina con la cadena liviana común IGKV1-39. La cadena VH MF1849 no pudo combinarse con la cadena liviana kappa variante y retener la especificidad y unión del antígeno.

Otros anticuerpos HER2 y HER3

- 5 Los anticuerpos que inhiben la función de HER2 o HER3 son conocidos en la técnica. Se construyeron más anticuerpos de acuerdo con la información publicada y se expresaron en células 293F Freestyle. Los anticuerpos anti-HER2 pertuzumab y trastuzumab se generaron en base a la información divulgada en el documento US2006/0212956 A1 (Genentech). El anticuerpo anti-HER3 #Ab6, se basó en la información divulgada en el documento WO 2008/100624 (Merrimack Pharmaceuticals, Inc.) y se reclonó en un vector de andamio IgG1. La información de los anticuerpos anti-HER3 1-53 y U1-59 se obtuvo del documento US 7.705.103 B2 (U3 Pharma AG). La información del anticuerpo anti-HER3 LJM716 se obtuvo del documento US 2012/0107306. La información para el constructo del anticuerpo anti-EGFR anti-HER3 dos en uno MEHD7945A se obtuvo del documento WO2010/108127.

Cribado de anticuerpos biespecíficos HER2xHER3

- 15 Se reclonaron VH del panel de anticuerpos HER2 y HER3 en los vectores modificados genéticamente cargados de manera que tras la expresión de las cadenas pesadas del anticuerpo se fuerza la heterodimerización de las cadenas pesadas dando como resultado la generación de anticuerpos biespecíficos después de la transfección. Se utilizaron tres estrategias diferentes para combinar los brazos de HER2 y HER3 en formato de IgG biespecífica:

1. HER2 (bloqueo del crecimiento independiente del ligando) xHER3 (bloqueo del crecimiento independiente del ligando)
- 20 2. HER2 (bloqueo del crecimiento independiente del ligando) xHER3 (bloqueo del crecimiento dependiente del ligando)
3. HER2 de diferentes contenedores de epítomos x HER3 (bloqueo del crecimiento dependiente del ligando)

En algunas combinaciones biespecíficas, los anticuerpos generados en el grupo 2 y 3 se superpusieron con el grupo 1.

- 25 Se produjo un total de 495 anticuerpos biespecíficos en formato de 24 pozos y se purificó. Se ensayó la capacidad de todos los anticuerpos para inhibir la proliferación de la línea celular pancreática BxPC-3-luc-2 que expresa HER2 y HER3 (Caliper). La potencia de los anticuerpos se determinó en un entorno HRG dependiente e independiente de HRG en una selección en blanco y negro con anticuerpos presentes en una concentración de 10 y 1 µg/ml. Se incluyó trastuzumab como anticuerpo de referencia y como anticuerpo de control negativo a las mismas concentraciones. La actividad funcional de los 80 mejores biespecíficos de HER2xHER3 (basados en la inhibición combinada) a 1 µg/ml se muestra en la Figura 2.

- 30 Se seleccionaron los anticuerpos (40 en total) que mostraban una mayor actividad inhibidora en comparación con el anticuerpo de control positivo, se reprodujeron y purificaron en un formato de 24 pozos y se volvieron a probar en la pantalla en blanco y negro BxPC-3-luc-2 a 10 y concentraciones de 1 mg/ml. Estos anticuerpos se valoraron adicionalmente en el ensayo MCF-7 dependiente de HRG y se compararon con la combinación de trastuzumab y pertuzumab (1:1) y un anticuerpo de control negativo. La Figura 3 muestra un ejemplo de curvas de titulación de tres anticuerpos biespecíficos en comparación con el anticuerpo HER3 parental y la combinación de trastuzumab + pertuzumab. Los anticuerpos monoclonales parentales se muestran en el panel superior y los anticuerpos biespecíficos se muestran en el panel inferior. (Figura 3).

- 40 La IC₅₀ para los anticuerpos biespecíficos, monoclonales y anticuerpos comparadores se calculó usando análisis de regresión no lineal con el software Prism. El software Graph Pad enumera los valores IC₅₀ de los anticuerpos biespecíficos en el ensayo MCF-7 y su actividad inhibidora en el ensayo BxPC3 para su comparación. Un panel de 12 anticuerpos biespecíficos HER2xHER3 tuvo una actividad inhibidora más potente en comparación con trastuzumab + pertuzumab. Además, los anticuerpos biespecíficos fueron igual o más potentes que el PG3178 monoclonal parental (Tabla 9).

- 45 Los anticuerpos biespecíficos que inhibían el crecimiento celular dependiente del ligando estaban compuestos de brazos de HER2 en combinación con los brazos de HER3 3178, 3163, 3099 y 3176. Tanto los brazos de HER2 como de HER3 de los biespecíficos más potentes eran como monoclonales bivalentes también capaces de inhibir la proliferación de SKBR-3 independiente de ligando (ambos brazos HER2 y HER3) (Tabla 6) o la proliferación de MCF-7 dependiente de ligando (brazos HER3) (Tabla 7). La mayoría de los anticuerpos potentes estaba compuesta por un brazo de HER2 que reconoce el dominio I en combinación con el anticuerpo 3178 anti-HER3.

Inhibición del crecimiento tumoral BxPC-3-luc2

Los anticuerpos descritos en la Tabla 9 se probaron en un modelo de xenoinjerto pancreático BxPC-3-luc2. La línea celular BxPC-3-luc2 expresa tanto HER2 como HER3 y se considera una línea celular de baja expresión de HER2. Se injertaron ortotópicamente ratones hembra CB17 SCID, de 8 a 10 semanas de edad al comienzo del estudio, en el

páncreas con 1×10^6 células tumorales en 20 μ l. Con este fin, los ratones fueron anestesiados y colocados sobre el lado derecho para exponer el lado izquierdo y se realizó una incisión de 0.5 cm en la región del flanco izquierdo. El páncreas y el bazo se exteriorizaron y se inyectaron 1×10^6 células tumorales en 20 μ l en el espacio subcapsular de la cola del páncreas. Una semana después de la implantación, se generaron datos de bioluminiscencia (BLI). 15 minutos antes de la formación de imágenes, todos los ratones recibieron inyecciones i.p. de 150 mg/kg de luciferina (D-luciferina-sal de potasio EF, cat. #E6552, Promega). Las imágenes BLI se realizaron una o dos veces por semana utilizando la vista del lado izquierdo. Los animales atípicos, basados en BLI/volumen tumoral, se eliminaron y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 7 ratones cada uno. El día experimental 8 se inició el tratamiento. Los animales del grupo de tratamiento con anticuerpos se dosificaron semanalmente durante 3 semanas consecutivas (días 0, 7, 14 y 21) con 30 mg/kg de anticuerpo. El día 0 del tratamiento, los animales recibieron el doble de la dosis de carga, es decir, 60 mg/kg de anticuerpo. La imagen final se realizó el día 31.

Se ejecutaron dos modelos de xenoinjerto de BxPC-3-luc2 con un panel diferente de anticuerpos bispecíficos y anticuerpos parentales. En el primer modelo de xenoinjerto de BxPC-3-luc2 (Figura 4), un grupo recibió el anticuerpo anti-RSV de control negativo (Ctrl IgG), un grupo recibió el anticuerpo de control trastuzumab y un grupo recibió el anticuerpo de control positivo trastuzumab + pertuzumab (1:1 v/v). Los siete grupos restantes recibieron uno de los anticuerpos monoclonales (PG) o bispecíficos (PB) PG3004, PG3178, PB3566, PB3710, PB3443, PB3448 y PB3441. Los detalles de la composición de los anticuerpos bispecíficos se muestran en la Tabla 9.

Los cinco anticuerpos bispecíficos ensayados fueron capaces de inhibir el crecimiento tumoral. La masa tumoral media (BLI) de los animales tratados con anticuerpos bispecíficos HER2 x HER3 fue similar a la de los animales tratados con la combinación de trastuzumab + pertuzumab. (Figura 4).

En el segundo modelo de xenoinjerto BxPC-3-luc2 (Figura 5), un grupo recibió el anticuerpo anti-RSV de control negativo (Ctrl IgG) y un grupo recibió la combinación de anticuerpos de control positivo trastuzumab + pertuzumab (1:1 v/v). Los cinco grupos restantes recibieron uno de los anticuerpos PG3163, PB3986, PB3990, PB4011 y PB3883. Para obtener detalles sobre los anticuerpos PB bispecíficos: Tabla 9. Estos anticuerpos bispecíficos contenían tres brazos de unión de HER3 diferentes combinados con el mismo brazo de HER2 MF2971 y un brazo de HER2 adicional combinado con el brazo de unión de HER3 MF3163. En este experimento, los tumores del grupo de control no mostraron el mismo nivel de crecimiento acelerado que en el primer experimento, lo que complica la interpretación de los resultados. Sin embargo, en comparación con trastuzumab + pertuzumab, los bispecíficos PB3883 y PB3990 HER2xHER3 tenían actividades inhibitoras similares (Figura 5).

En base a los datos in vivo e in vitro, se seleccionó un panel bispecífico de anticuerpos de los cuales los brazos de HER2 estaban compuestos por MF2971, MF3004, MF1849 y el brazo de HER3 estaba compuesto por MF3178. Los brazos de MF2971 y MF3004 eran de origen de ratón y estaban humanizados.

Unión del anticuerpo bispecífico HER2xHER3 en comparación con los anticuerpos monoclonales parentales

La unión de anticuerpos bispecíficos HER2xHER3 en comparación con sus homólogos parentales se determinó mediante análisis FACS. Se realizó FACS en células BxPC-3-luc2 y células MCF-7 con una titulación en serie de anticuerpos que variaba desde 2.5 μ g g/ml-0.01 μ g g/ml. El panel de anticuerpos ensayado estaba compuesto por el anticuerpo bispecífico PB3566 y sus anticuerpos parentales, el anticuerpo anti-HER3 PG3178 y el anticuerpo anti-HER2 PG3004. Se representaron los datos de MFI y los gráficos en ambas líneas celulares muestran que el PB3566 bispecífico se une más eficazmente a ambas líneas de células tumorales en comparación con el anticuerpo anti-HER3 PG3178 y el anticuerpo anti-HER2 PG3004. (Figura 6).

Humanización de MF2971 y MF3004

Se humanizaron MF2971 y MF3004 de acuerdo con la tecnología conocida en la técnica. Un total de siete secuencias variantes humanizadas/desimmunizadas de MF2971 se expresaron, validaron y caracterizaron in vitro como combinación monoclonal y bispecífica con el anticuerpo específico de HER3 de MF3178. Se hizo lo mismo para siete secuencias variantes de MF3004, que se crearon reemplazando el HCDR3 de MF2971 en las siete variantes de MF2971 con el HCDR3 de MF3004. Se analizó la expresión, integridad, estabilidad térmica y actividad funcional de todas las variantes humanizadas. En base a la producción, integridad, estabilidad e integridad funcional, se eligió una variante de MF2971 (2971-var2) como la variante humanizada óptima de VH para ser utilizada en un formato bispecífico con MF3178. Este 2971-var2 pasó a llamarse MF3958. La combinación bispecífica de HER2xHER3 MF3958xMF3178 dio como resultado PB4188.

Estudios analíticos, de purificación y producción a gran escala de PB4188

Se cultivaron células 293F Freestyle adaptadas a la suspensión en matraces Erlenmeyer en una meseta de agitación hasta una densidad de 3.0×10^6 células/ml. Las células se sembraron en matraces de 4 litros a una densidad de $0.3\text{--}0.5 \times 10^6$ células viables/ml. Las células se transfectaron transitoriamente con la mezcla de ADN:PE1 estéril individual y se cultivaron adicionalmente. Siete días después de la transfección, el medio acondicionado que contenía el anticuerpo bispecífico se recogió mediante centrifugación a baja velocidad, 5 minutos 1000 g, seguido de centrifugación a alta velocidad, 5 minutos a 4000 g. El medio acondicionado recogido se concentró sobre un casete hydrosart Satorius de 5 kDa hasta aproximadamente 600 ml y posteriormente se diafiltró contra 4 L de PBS. Los

anticuerpos se unieron en columna a ~35 ml de MabSelectSure XL (11°C). Las proteínas unidas específicamente a A se eliminaron lavando la columna en modo de flujo inverso con 150 ml de PBS, 150 ml de PBS que contenía NaCl 1 M, 100 ml de PBS. Los anticuerpos unidos se eluyeron usando citrato 100 mM pH 3.0 en modo de flujo inverso y se recogieron fracciones de 5 ml en tubos de 10 ml que contenían 4 ml de 1Tris pH 8.0 para la neutralización. Los anticuerpos eluidos se purificaron adicionalmente mediante filtración en gel usando superdex 200 50/1000. El anticuerpo purificado se esterilizó por filtración usando un filtro de jeringa de 0.22 µm. La concentración de IgG se determinó mediante la medición de la DO280 y la concentración de proteína se calculó basándose en la secuencia de aminoácidos. Se ensayó la proteína para la agregación (HPSEC), la pureza (SDS-PAGE, nMS, IEX e IEF). Las muestras de proteína se almacenaron a -80°C.

10 Purificación de IgG para estudios analíticos y de xenoinjertos.

Se realizaron purificaciones a mediana escala en un AKTA 100 Explorer usando columnas HiTrap MabSelect Sure y columnas de desalación HiTrap. Las muestras se cargaron a 5 ml/min. La columna se lavó con 2 volúmenes de columna de PBS. Se eluyó la IgG a pH 3.0 con regulador citrato 0.1 M. A continuación, la muestra se desaló y terminó en un regulador final de PBS pH 7.4. Las IgG se filtraron a través de un filtro de 0.45 µm (Sartorius). La concentración de IgG se midió usando Octet con sensores de proteína A. Se ensayó la proteína para la agregación (HPSEC), la pureza (SDS-PAGE, nMS, IEX e IEF). Las muestras de proteína se almacenaron a -80°C.

Características analíticas de PB4188

El PB4188 (MF3958xMF3178) se sometió a análisis por HP-SEC y CIEH-HPLC (columna TSK gel-STAT de 7 µm, 4.6 mm de DI x 10 cm L). El perfil analítico de PB4188 fue en general consistente con el comportamiento de la IgG1 monoespecífica normal, tal como el brazo PG3958 de HER2 parental y el anticuerpo de control monoclonal anti-RSV (Figura 7).

Determinación de afinidad

La afinidad de unión monovalente de PB4188 y PB3448 por HER2 y HER3 recombinantes se determinó mediante SPR (Biacore T100). Se utilizó Biacore™ T100 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) para realizar todos los experimentos descritos. La preparación de la superficie del sensor y los análisis de interacción se realizaron a 25°C. El regulador y los reactivos Biacore se adquirieron de GE Healthcare. Se realizó recubrimiento con ErbB2-Fc y ERbB3-Fc (RND) la superficie de un chip sensor CM5 en regulador de acetato de potasio (pH 5.5) al nivel de inmovilización objetivo de 500 RU. El regulador de ejecución fue HBS (solución salina tamponada con hepes): HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.005%; 0.2 µm) esterilizado por filtro. Los anticuerpos biespecíficos se diluyeron a 100, 50, 20, 10, 1 y 0.1 nM en HBS y se procesaron a un caudal alto (30 µl/min) sobre la superficie acoplada al antígeno del chip sensor CM5. Con el software de evaluación BIA, un modelo de ajuste de curva para la interacción monovalente 1:1 permitió la determinación de las afinidades de los brazos de HER2 (interacción monovalente), se pudieron determinar las afinidades de los brazos de HER2. Debido a la baja tasa de apagado del brazo de HER3, no se pudo determinar la afinidad. Para determinar la afinidad del brazo de HER3, se recubrió PB4188 con un chip sensor CM5 al nivel de inmovilización objetivo de 500 RU. Los antígenos Her2-Fc y Her3-Fc se diluyeron a 100, 50, 20, 10, 1 y 0,1 nM en HBS y se corrieron a un caudal elevado (40 µl/min) sobre la superficie de PB4188. Para determinar los valores de K_{activado} y $K_{\text{desactivado}}$, se utilizó el software de evaluación BIA junto con un modelo que tiene en cuenta que se recubre una molécula monovalente en la superficie del chip sensor y que el antígeno ErbB3-Fc era una molécula bivalente. Las afinidades de PB4188 y PB3448 se muestran en la Tabla 10.

40 Determinación de afinidad en células

Las afinidades de unión también se determinaron mediante medidas de afinidad celular en estado estacionario usando células BT-474 y SK-BR-3. Se analizaron cuatro IgG:1) PB4188 (HER2xHER3 biespecífico), que contiene anticuerpo anti-HER2 3958 y anticuerpo anti-HER3 3178; 2) PB9215 (HER3xTT biespecífico), que contiene el anticuerpo 3178 anti-HER3 y el anticuerpo 1337 anti-TT (toxide tetánico); 3) PB9216 (HER2xTT biespecífico), que contiene anticuerpo anti-HER2 3958 y anticuerpo anti-TT 1337; 4) Herceptin (HER2 monoespecífico). Las IgG se marcaron radiactivamente con ^{125}I utilizando tubos de yodación prerrevestidos IODO-GEN® (Pierce) e instrucciones asociadas. Las IgG marcadas se diluyeron hasta una actividad de $\sim 1\text{-}2 \times 10^8$ cpm/ml en Tris-HCl 25 mM, NaCl 0.4 M, BSA al 0.25%, EDTA 5 mM, NaN_3 al 0.05%. Las concentraciones de proteínas se determinaron con el BCA Protein Assay Kit (Pierce). El análisis de citometría de flujo de la IgG marcada y no marcada usando células BT-474 y SK-BR-3 no mostró signos de reducción en la unión o sólo fue menor después del marcaje. Las mediciones de la afinidad celular en estado estacionario se realizaron como sigue. Las células se sembraron en placas de 96 pozos y se incubaron a 4°C con diversas concentraciones de IgG marcada. Se eliminó la radiactividad no unida después de 4 horas y se midió la radiactividad unida a las células usando un contador de pocillos gamma. La unión no específica se midió agregando una concentración de bloqueo del receptor (exceso de 100 veces) de anticuerpo no marcado. Cada condición se probó por triplicado y se realizaron tres experimentos independientes por anticuerpo. Los valores de K_D se calcularon en base a un modelo de regresión no lineal que compensa la unión no específica, utilizando Prism 6.0 d (software GraphPad). En la Figura 20 se proporcionan gráficos que incluyen curvas ajustadas para la unión de la IgG de HER2xHER3 (PB4188) a ambas líneas celulares. Los datos de K_D para los 24 ensayos, incluidos los valores medios, se dan en la Tabla 12. En resumen, los valores de K_D medios determinados utilizando células BT-474 y SK-BR-3

fueron 3.2 y 2.0 nM para HER2xHER3, 3.7 y 1.3 nM para Herceptin, 3.9 y 2.3 nM para HER2xTT y 0.23 y 0.99 nM para HER3xTT, respectivamente. Por tanto, PB4188 muestra una mayor afinidad por HER3 en comparación con HER2, lo que contrasta con la molécula biespecífica de HER2xHER3 MM-111 que se dirige a HER2 con una mayor afinidad en comparación con HER3.

5 Actividad antiproliferativa en células de cáncer de mama amplificadas con HER2

JIMT-1 en agar blando

Se ensayó la potencia de PB3448 y PB4188 para inhibir el crecimiento de las células JIMT-1 resistentes a trastuzumab en agar blando. Con este fin, se prepararon placas de cultivo celular en suspensión de 96 pozos. Se vertieron 100 µl de la capa inferior de agar blando (concentración final al 0.6% en medio completo) y se dejó solidificar. Luego se añadieron 50 µl de la capa superior de agar blando (concentración final al 0.4%) que contenía 10.000 células JIMT-1/pozo, se solidificaron y dichas placas de 96 pozos se incubaron durante la noche a 37°C, CO₂ al 10%. Al día siguiente, se añadió un anticuerpo de control negativo, pertuzumab + trastuzumab (1:1 v/v), PB3448 y PB4188 en medio DMEM en una titulación semilogarítmica que variaba de 10-0.003 µg/ml. Posteriormente, el ensayo se incubó en incubadoras de cultivo celular durante 8 días. Finalmente, las células se incubaron con Alamar Blue durante 3-5 h a 37°C y se determinó la intensidad de la fluorescencia (excitación: 560 nm; emisión: 590 nm). Se muestra un ejemplo de inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de JIMT-1 por PB3448 y PB4188. (Figura 8).

BT-474 y SKBR-3 en matrigel

Se ensayó la potencia de PB3448 y PB4188 para inhibir el crecimiento de células BT-474 y SKBR-3. Las células se probaron en la empresa Ocello con sede en Leiden, Países Bajos, que cultiva células en matrigel tridimensional y utiliza el análisis de componentes principales para distinguir las células no tratadas de las tratadas. Se sembraron 2000 células SK-BR-3 o 2250 BT474 en 15 µl de matrigel por pozo de una placa de 384 pozos (Greiner 781091). Al día siguiente, se añadió una titulación semi-logarítmica de 10 a 0.003 µg/ml de anticuerpos en medio de cultivo en ausencia o presencia de 5 ng/ml de HRG. Los anticuerpos de prueba incluyeron un anticuerpo de control negativo, pertuzumab + trastuzumab (1:1 v/v), PB3448, PB4188 y el anticuerpo biespecífico anti-EGFRxHER3 dos en uno MEHD7945A. Además, se incluyó una titulación dependiente de la dosis de HRG como control positivo. Cada dosis se probó por cuadruplicado. Las células se incubaron durante 7 días en una incubadora de cultivo celular a 37°C, CO₂ al 5%. A continuación, las células se fijaron y el citoesqueleto de actina de las células se tiñó con faloidina y los núcleos se tiñeron con Hoechst. A continuación, se tomaron imágenes fluorescentes a diferentes niveles a través del gel (pila Z) y se superpusieron las imágenes. Se midió una amplia gama de características morfológicas (800 en total). Solo se seleccionaron para el análisis las características que difirieron entre los tratamientos medio y HRG. Las características que se asociaron con el crecimiento, el área media del esferoide y los núcleos por esferoide fueron más significativamente diferentes entre los tratamientos con medio y HRG. Se realizaron análisis multiparamétricos y de un solo parámetro. Para las mediciones de un solo parámetro, se realizaron pruebas t para comparar tratamientos (HRG o anticuerpo) con el medio. Se determinaron los valores P para cada punto. Se utilizó el análisis de componentes principales (PCA), un método para encontrar combinaciones de baja dimensión de datos de alta dimensión que capturan la mayor parte de la variabilidad en relación con la concentración de anticuerpos, para graficar los datos. La Figura 9 demuestra el efecto de pertuzumab + trastuzumab (1:1 v/v), PB3448 y PB4188 en presencia de HRG. En ambas líneas celulares de cáncer de mama amplificadas con HER2, PB4188 mostró una actividad superior en comparación con pertuzumab + trastuzumab, PB3448 y el anticuerpo dos en uno MEHD7945A en presencia de HRG.

40 Actividad antiproliferativa superior de PB4188 en presencia de HRG en células de cáncer de mama amplificadas con HER2

La actividad de PB4188 en presencia de 10 ng/ml de HRG sobre SKBR-3 y BT-474 se comparó con un panel de anticuerpos HER2, HER3 y combinaciones de los mismos. El ensayo se realizó en matrigel, como se describió anteriormente, y se analizaron las características morfológicas. Los datos de PCA representados en la Figura 10a muestran la proliferación inducida por HRG y la ramificación/invasión de células SKBR-3 en matrigel. La Figura 10b muestra que el anticuerpo PB4188 puede revertir completamente el fenotipo inducido por HRG, mientras que la combinación de los anticuerpos monoclonales parentales (PG3958 + PG3178) no tiene ningún efecto. Además, PB4188 fue mucho más eficaz en comparación con todos los anticuerpos anti-HER3 probados (Figura 10c). Además, las combinaciones de los anticuerpos anti-HER3 individuales con trastuzumab (el estándar actual de atención en el cáncer de mama metastásico (mBC)) no pudieron revertir el fenotipo inducido por HRG (Figura 10d). La adición de trastuzumab a PB4188 en presencia de HRG redujo la proliferación y ramificación/invasión de células SK-BR-3 en comparación con PB4188 solo (Figura 10e).

Actividad antiproliferativa superior de PB4188 en células de cáncer gástrico amplificadas con HER2 en comparación con los anticuerpos monoclonales HER2 y HER3.

55 La sobreexpresión de NRG1-β1 es un mecanismo de resistencia clave contra las terapias dirigidas a HER2 (Wilson, 2012). Para evaluar si la sobreexpresión de NRG1-β1 interferiría con la potencia antiproliferativa de PB4188, se probó un panel de anticuerpos a 100 ng/ml de HRG en la línea celular de cáncer gástrico N87 (HER2 amplificado). Se cultivaron células N87 en RPMI 1640 complementado con FBS inactivado por calor al 10%. Para el ensayo de

proliferación, se lavaron cultivos celulares subconfluentes de células N87 con PBS tripsinizado y se inactivó tripsina añadiendo medio de cultivo. Las células se lavaron dos veces en grandes volúmenes de medio de ensayo (medio RPMI 1640 que contenía BSA al 0.05% y 10 µg/ml de holo transferrina). Los anticuerpos se diluyeron en una titulación semilogarítmica que varió entre 1 y 0.0001 µg/ml. Las células se añadieron a una densidad de 10000 células/pozo en presencia de una concentración final de 100 ng/ml de HRG. Las células se cultivaron durante 3 días a 37°C, 5% de CO₂, en 95% de humedad relativa. Se añadió Alamar Blue™ (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubó durante 6 horas a 37°C, 5% de CO₂, en 95% de humedad relativa en la oscuridad. Se midió la fluorescencia a una excitación de 550 nm con una longitud de onda de emisión de 590 nm. PB4188 mostró una actividad superior sobre los anticuerpos monoclonales anti-HER2 o anti-HER3 (Figura 11).

10 Los anticuerpos biespecíficos HER2XHER3 inducen ADCC

La actividad de ADCC es un importante mecanismo de acción antitumoral para los anticuerpos terapéuticos en el cáncer. Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos a la familia de receptores HER como cetuximab y trastuzumab inducen la ADCC. La actividad ADCC inicial y mejorada de PB4188 y PB3448 se determinó en ensayos ADCC in vitro validados. El trastuzumab y un anticuerpo de control negativo se incluyeron como anticuerpos de control en el experimento. Se obtuvieron fracciones de sangre completa y PBMC de donantes sanos. Cada anticuerpo se probó contra las células diana que expresan HER2 alto (SK-BR-3) y HER2 bajo (MCF-7). Las células diana se cargaron con ⁵¹Cr (Amersham) y se opsonizaron con las concentraciones indicadas de anticuerpo. Se utilizó sangre completa o fracción de PBMC como células efectoras en una reacción de 200 µl en RPMI 1640 + FCS inactivado por calor al 10%. Las células se incubaron juntas durante 4 h, y la lisis se estimó midiendo la radiactividad en el sobrenadante usando un centelleador y. El porcentaje de lisis específica se calculó de la siguiente manera: (cpm experimental - cpm basal)/(cpm máximo - cpm basal) × 100, con lisis máxima determinada en presencia de Triton X-100 al 5% y lisis basal en ausencia de anticuerpo y efectores. Como se muestra en la Figura 12, el anticuerpo biespecífico PB3448 mostró una actividad ADCC similar en comparación con la combinación pertuzumab + trastuzumab. El anticuerpo biespecífico PB4188 fue eficaz a concentraciones elevadas de anticuerpo (10 µg/ml).

25 Los anticuerpos biespecíficos HER2XHER3 muestran una ADCC más alta en comparación con la combinación de anticuerpos parentales

En una configuración de ADCC diferente, se usó el bioensayo informador de ADCC (Promega). El bioensayo utiliza células Jurkat modificadas genéticamente que expresan de forma estable el receptor FcγRIIIa, variante V158 (alta afinidad) o F158 (baja afinidad), y un elemento de respuesta NFAT que impulsa la expresión de luciferasa de luciérnaga. El ensayo se validó comparando los datos obtenidos con el ADCC Reporter Bioensayo con el ensayo clásico de liberación de ⁵¹Cr. Los ensayos de ADCC se realizaron utilizando el kit Promega ADCC Bioassay utilizando placas de 384 pozos blancos. En esta configuración experimental, las células SKBR-3 se sembraron en placa a una densidad de 1000 células/pozo en 30 µl de medio de ensayo (RPMI con suero de IgG bajo al 4%) 20-24 horas antes del bioensayo. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo. A continuación, se generó una dilución en serie de los anticuerpos, PB4188 y su anti-HER2 PG3958 y anti-HER3 PG3178 parentales, así como la combinación de los mismos, en duplo. Se añadieron 10 µl de diluciones de anticuerpos a los pozos. La concentración inicial del anticuerpo fue de 10 µg/ml y se generó una dilución en serie semilogarítmica de 10 puntos para proporcionar una curva de dosis-respuesta completa. Finalmente, se añadieron 5 µl de células efectoras ADCC Bioensayo (15000 células/pozo, V158). Las células se incubaron durante 6 horas a 37°C. A continuación, se añadieron 15 µl de sustrato de luciferasa BIO-Glo y 5 minutos después se detectó luminiscencia en un lector de placas. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 13. Los anticuerpos anti-HER2xHER3 biespecíficos PB4188 mostraron una potencia ADCC más alta en comparación con los monoclonales HER2 y HER3 parentales o una combinación de los mismos.

Mejora de ADCC de PB4188

La actividad de ADCC se puede potenciar mediante diferentes técnicas, siendo una de ellas la eliminación de fucosa. La eliminación de fucosa ha resultado en un aumento de la actividad antitumoral en varios modelos in vivo [Junttila, 2010]. Para maximizar la actividad de PB4188, se aplicó la tecnología de afucosilación (Cheng Liu and Andreia Lee. ADCC Enhancement Technologies for Next Generation Therapeutic Anticuerpo. Anticuerpo terapéutico - Trends in Bio/Pharmaceutical Industry 2009 [13-17]), evitando así la fucosilación de los N-ligados estructura de carbohidratos en la región Fc. La potencia ADCC de PB4188 afucosilado en comparación con el PB4188 de tipo salvaje se determinó en un ensayo de liberación de ADCC ⁵¹Cr usando células de baja expresión de HER2 (MCF-7) y células amplificadas con HER2 (SK-BR-3). Ambos anticuerpos se aplicaron en una dilución en serie y en el ensayo se incluyeron un anticuerpo de control negativo y trastuzumab. La Figura 14 muestra el aumento en la potencia ADCC de PB4188 afucosilado en comparación con la versión de tipo salvaje y/o trastuzumab en células que expresan tanto HER2 alto como bajo.

55 PB4188 afucosilado muestra una actividad ADCC superior con receptores FcγRIII de baja afinidad

La actividad de PB4188 afucosilada se ensayó en células indicadoras de ADCC que contenían la variante del receptor FcγRIIIa V158 (alta afinidad) o la variante del receptor FcγRIIIa F158 (baja afinidad). Se añadió una titulación en serie de anticuerpo, es decir, anticuerpo de control, trastuzumab y PB4188 afucosilado, en combinación con células indicadoras de ADCC que albergan las diferentes variantes de FcγRIIIa a células SK-BR-3 adherentes. La actividad

de ADCC se midió midiendo la actividad de luciferasa. El PB4188 afucosilado mostró la misma actividad en comparación con el trastuzumab en combinación con la variante del receptor V158 FcγRIIIa de alta afinidad. Por el contrario, el PB4188 afucosilado mostró una actividad ADCC superior en comparación con el trastuzumab en combinación con la variante del receptor FcγRIIIa F158 de baja afinidad. (Figura 15).

5 Estudio de xenoinjerto JIMT-1

Se cultivaron células de carcinoma de mama humano JIMT-1 en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina G de sodio, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina, 25 µg/ml de gentamicina y glutamina 2 mM hasta el momento de implantación. El día de la implantación, se recogieron células de mama JIMT-1 durante el crecimiento en fase logarítmica y se resuspendieron en PBS frío. Los ratones hembra CB.17 SCID (Charles River) tenían 8 semanas de edad el día 1 del estudio y tenían un rango de peso corporal de 16.5 a 20.7 g. Cada ratón se inyectó por ruta subcutánea en el flanco derecho con 5×10^6 células tumorales (0.2 ml de suspensión de células). Los tumores se midieron con un calibrador en dos dimensiones para controlar el tamaño como el volumen medio dos veces por semana. Una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente 100-150 mm³ de tamaño, los animales se inscribieron en el estudio de eficacia. Los animales atípicos -volumen del tumor- se eliminaron y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 10 ratones cada uno. Los ratones se inyectaron una vez a la semana (anticuerpos) o diariamente (lapatinib) durante un período de cuatro semanas. Los detalles de los grupos de tratamiento se muestran en la Tabla 11.

Los tamaños de los tumores se midieron semanalmente mediante medición con calibre. El estudio de eficacia reveló que PB4188 en ambos esquemas de dosificación fue igual de eficaz y más potente que el lapatinib o la combinación de pertuzumab y trastuzumab. Los datos se muestran en las Figuras 17 y 18.

PB4188 puede superar la resistencia mediada por HRG

La sobreexpresión de NRG1-β1 es un mecanismo de resistencia clave contra las terapias dirigidas a HER2 (Wilson, 2012). Se probó PB4188 en comparación con su anticuerpo monoclonal PG3178 anti-HER3 parental en una titulación en serie en presencia de una concentración creciente de HRG (NRG1-β1 EGF). Con este objetivo, se cultivaron células N87 en RPMI 1640 complementado con FBS inactivado por calor al 10%. Para el ensayo de proliferación, se lavaron cultivos celulares subconfluentes de células N87 con PBS tripsinizado y se inactivó tripsina añadiendo medio de cultivo. Las células se lavaron dos veces en grandes volúmenes de medio de ensayo (medio RPMI 1640 que contenía BSA al 0.05% y 10 µg/ml de holo transferrina). Los anticuerpos se diluyeron en una titulación semilogarítmica que variaba de 1 a 0.0001 µg/ml. Las células se añadieron a una densidad de 10000 células/pozo en presencia de una concentración creciente de HRG (0.04-39.5 nM). Las células se cultivaron durante 3 días a 37°C, 5% de CO₂, en 95% de humedad relativa. Se añadió Alamar Blue™ (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubó durante 6 horas a 37°C, 5% de CO₂, en 95% de humedad relativa en la oscuridad. Se midió la fluorescencia a una excitación de 550 nm con una longitud de onda de emisión de 590 nm. PB4188 mostró una actividad superior en comparación con el anticuerpo monoclonal anti-HER3 parental (Figura 19).

Por tanto, en el caso de un mecanismo de escape, como por ejemplo la sobreexpresión de NRG1-β1, se prefiere un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención.

Mapeo de epítomos de experimentos de mutagénesis Shotgun de IgG específicas de HER2/HER3

Se utilizó mutagénesis de exploración con alanina para mapear los epítomos de PG3958 y PG3178 para HER2 y HER3 respectivamente. En el ensayo de mutagénesis Shotgun, se generan clones mediante los cuales cada residuo de aminoácido del dominio extracelular (ECD) de HER2/HER3 se sustituye por alanina. A continuación, se preparó una matriz de células mediante transfección inversa (Patente US2011/0077163A1). Por lo tanto, el ADN de cada clon se mezcló con lipofectamina y la mezcla se colocó en un pozo dedicado de una placa de 384 pozos. Se añadieron células HEK293T a cada pozo y se midió la expresión de proteína 24 horas después. Posteriormente, se midió la reactividad de los anticuerpos mediante tinción inmunofluorescente que condujo a mapas de unión e identificación de residuos críticos para la unión de anticuerpos. Los niveles de expresión de los constructos ECD de HER2 y HER3 se verificaron mediante análisis FACS utilizando anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente (mAb de R&D 1129 (HER2) y mAb de R&D 66223 (HER3)).

HER2

Se ensayó la unión de PG3958 Fab monovalente a mutantes de HER2 ECD a una concentración de 0.25 µg/ml en el ensayo y se utilizaron condiciones de lavado rigurosas (pH 9.0, NaCl 350 mM). Esto dio como resultado la identificación de tres residuos "críticos" (T144, R166, R181) en HER2 que mostraban menos del 35% de unión residual del Fab PG3958 en comparación con WT HER2 mientras que conservaba la unión del mAb de control. Dos residuos (P172, G179) que se sitúan cerca de los residuos críticos en la estructura de HER2 mostraron una pérdida de unión significativa, pero menos grave, y se denominaron residuos "críticos secundarios" (Tabla 13 y Figura 21A). Todos estos residuos expuestos a la superficie están ubicados en el dominio I de HER2 y juntos forman un parche discontinuo en la superficie de la molécula de HER2.

Experimentos de confirmación del epítomo de HER2

Los constructos que codifican HER2 ECD de tipo salvaje (WT) y las variantes de HER2 ECD enumeradas en la Tabla 13 se expresaron en células CHO-K1. Se seleccionaron tres residuos del Dominio I que están expuestos en la superficie y estructuralmente cerca de los residuos críticos determinados para un análisis adicional. Se generaron mutaciones puntuales de T164, S180 y D143 a tirosina en el constructo HER2 ECD y los constructos resultantes también se expresaron en CHO-K1. La variante L159A HER2 ECD se expresó en células CHO-K1 como muestra de control.

El anticuerpo biespecífico PG3958xTT ensayado para la unión a las variantes de ECD en un experimento de titulación FACS. El anticuerpo anti-HER2 trastuzumab que se une al dominio IV de HER2 se usó para verificar la expresión de HER2 ECD en la superficie celular. Se trazaron los valores medios de MFI y para cada curva se calculó el AUC utilizando el software GraphPad Prism 5. Se usó la unión de WT HER2 para normalizar los datos. Los datos de FACS mostraron que además de T144A, R166A, R181A, P172A, G179A, las mutaciones T164Y y S180Y dieron como resultado una reducción significativa en la unión del anticuerpo PG3958xTT (Figura 22). La mutación D143Y resultó en una pérdida severa de expresión, como se demostró por la unión disminuida del mAb de control, por lo que no pudo determinarse su papel potencial en el epítipo PG3958.

HER3

El análisis de unión de IgG PG3178 a 0,25 µg/ml a mutantes de HER3 ECD en FACS dio como resultado la identificación de dos residuos denominados "críticos" (F409, R426) para los que la mutación a alanina provocó una pérdida sustancial de unión en comparación con WT HER3, mientras que se retuvo la unión del mAb de control (Tabla 14 y Figura 23). Ambos residuos están ubicados en el dominio III de HER3 y espacialmente distantes. Además, F409 está sepultado en el núcleo hidrófobo de HER3, lo que hace que sea poco probable que forme parte del epítipo PG3178.

Experimentos de confirmación del epítipo de HER3

Se transfectaron células CHO-K1 con constructos de mutación HER3 ECD (enumeradas en la Tabla 14), WT HER3 ECD y dos constructos de control (H407A e Y424A). La unión de PG3178 a las variantes de ECD de HER3 se probó en un experimento de titulación FACS. Se incluyeron dos anticuerpos de control, dominio de unión I (MM-121) y dominio III (MEHD7945A) de HER3 para verificar la expresión de ECD de HER3 en la superficie celular. Se trazaron los valores medios de MFI y para cada curva se calculó el AUC utilizando el software GraphPad Prism 5. Se utilizó la unión de WT HER3 para normalizar los datos. Se demostró que la mutación R426A era crítica para la unión de PG3178, mientras que la unión a F409A no pudo confirmarse debido a la pérdida de expresión en la superficie celular (Figura 24).

Actividad de PB4188 en cardiomiocitos in vitro

HER2 está implicado en el crecimiento, reparación y supervivencia de cardiomiocitos adultos como parte de una red de señalización que implica el complejo receptor de hereulina HER2:HER4. La cardiotoxicidad es un factor de riesgo conocido en la selección de HER2 y la frecuencia de complicaciones aumenta cuando se usa trastuzumab junto con antraciclinas, lo que induce estrés cardíaco. Se utilizó un sistema modelo basado en cardiomiocitos derivados de células madre humanas para probar la toxicidad potencial de PB4188 y compararlo con trastuzumab y la combinación de trastuzumab y pertuzumab en presencia de la antraciclina doxorrubicina. Se sembraron cardiomiocitos derivados de células madre humanas (Pluriomics BV) a una concentración de 20.000 por pozo en placas de ensayo blancas de fondo plano (Corning 655098). El día 5 de cultivo, se reemplazó el medio por medio de cultivo libre de glucosa y galactosa suplementado con 10 ng/ml de HRG. El día 7 se añadieron los anticuerpos de prueba en combinación con doxorrubicina (3 µM). La viabilidad celular se ensayó el día 9 usando el ensayo Glo de título de células Promega. Los anticuerpos mono-específicos se probaron en concentraciones únicas de 68 nM mientras que el PB4188 se probó a tres concentraciones en presencia de doxorrubicina 3 µM. La Figura 25 muestra que la viabilidad del cardiomiocito no se vio afectada por todas las concentraciones de PB4188 ensayadas. Por el contrario, trastuzumab y la combinación de trastuzumab y pertuzumab redujeron la viabilidad de las células de los cardiomiocitos.

Unión de PB4188 a células con diferentes niveles de HER2

La unión de PB4188 en comparación con trastuzumab y el anticuerpo HER3 U1-59 se analizó mediante FACS en líneas celulares de cáncer de mama y gástrico que expresaban diferentes niveles de HER2. Las células se consideraron HER2+++ si expresan millones de copias de HER2 y/o son amplificadas por el gen HER2. Se utilizaron las siguientes líneas celulares: MCF-7 (HER 2+); MDA-MB-468 (HER2+, MKN-45 (HER2+), MDA-MB-175 (HER2+), MDA-MB-453 (HER2++), MDA-MB-361 (HER2++), ZR-75-1 (HER2++), JIMT-1 (HER2+++), BT-474 (HER2+++), SKBR-3 (HER2+++), SK-OV-3 (HER2+++), N87 (HER2+++). Células de un cultivo de crecimiento exponencial se recogieron con tripsina y se diluyeron a 10⁵ células/ml en regulador FACS (PBS/BSA al 0.5%/EDTA 0.5 mM). Se añadieron 1-2 10⁵ células a cada pozo en una placa de 96 pozos con fondo en U. Las células se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g a 4°C. El sobrenadante se descartó invirtiendo la(s) placa(s) anterior(es), seguido de un movimiento rápido. Se agregaron 50 µl de cada muestra de IgG en una dilución en serie de 3.16 ng a 10 µg/ml y se incubó durante 1 hora. Las células se centrifugaron una vez, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con regulador FACS. Se añadieron 50 µl diluidos 1:100 de IgG gamma PE de ratón (Invitrogen) y se incubaron durante 30-

60 minutos en hielo en la oscuridad. Las células se centrifugaron una vez, se eliminó el sobrenadante y se lavaron dos veces con regulador FACS. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto en un entorno HTS. La cantidad de anticuerpo unido se evaluó mediante la mediana de fluorescencia. Se trazaron los datos y se determinó el área bajo la curva (AUC, una medida acumulativa de la intensidad de fluorescencia media) para cada anticuerpo por línea celular probada (Figura 26).

A partir de este experimento se concluye que PB4188 tiene una mayor afinidad de unión por las células HER2+++, las células HER++ y las células HER+ en comparación con el trastuzumab.

Unión simultánea con trastuzumab

PB4188 y trastuzumab no compiten por unirse a HER2

El PB4188 se une al dominio I de la proteína HER2 mientras que el epítipo de unión de trastuzumab se localiza en el dominio IV. Para demostrar que ambos anticuerpos no compiten por la unión de HER2, se realizó un ensayo de unión con células de mama SKBR-3 amplificadas con HER2. Se dejó que el primer anticuerpo no marcado se uniera a SKBR-3 a concentraciones saturadas. A continuación, se añadió PB4188 marcado con FITC en un intervalo de titulación y se midió la fluorescencia mediante FACS. La Figura 27 demuestra que PB4188^{FITC} se unía con la misma eficacia a las células en presencia de trastuzumab o el control negativo. La preincubación de células SKBR-3 con PB4188 evitó que PB4188^{FITC} se uniera. Por tanto, trastuzumab y PB4188 no compiten por unirse a HER2.

El direccionamiento al dominio I de HER2 por una molécula biespecífica de HER2xHER3 puede superar la resistencia a la heregulina

Para probar si la orientación de PB4188 en el dímero HER2xHER3 era preferida para inhibir la proliferación celular en condiciones de estrés HRG, se generaron anticuerpos biespecíficos compuestos por el brazo HER3 3178 y los brazos HER2 dirigidos al dominio I, II, III o IV. Se generaron dos anticuerpos biespecíficos HER2xHER3 para cada uno de los dominios I-IV de HER2. Los brazos de HER2 incluían: dominio I de orientación MF3958 y MF3003; dominio II de direccionamiento de MF2889 y MF2913; MF1847 y MF3001 dominio de dirección III y MF1849 y MF1898 dominio de dirección IV. Cada brazo de HER2 Fab se combinó con el brazo de 3178 HER3 Fab y se probó su potencia para inhibir la proliferación celular en presencia de altas concentraciones de heregulina. Las titulaciones de anticuerpos se realizaron en células MCF-7 de baja expresión de HER2 y células N87 y SK-BR-3 que sobreexpresan HER2. Los cultivos celulares subconfluentes de células N87, SK-BR-3 y MCF-7 se lavaron con PBS tripsinizado y la tripsina se inactivó añadiendo medio de cultivo. Las células se lavaron dos veces en grandes volúmenes de medio de ensayo (medio RPMI 1640 que contenía BSA al 0.05% y 10 µg/ml de holo transferrina). Los anticuerpos se diluyeron en una titulación semilogarítmica. Las células se añadieron a una densidad de 10000 células/pozo (N87, SKB-BR-3) y 5000 células/pozo de MCF-7 en presencia de la concentración de estrés definida experimentalmente de HRG (10 nM SK-BR-3, 100 nM N87 y MCF -7). Las células se cultivaron durante 3-4 días a 37°C, 5% de CO₂, en un 95% de humedad relativa. Se añadió Alamar BlueTM (Invitrogen) para evaluar la proliferación. La absorbancia se midió a una excitación de 550 nm con una longitud de onda de emisión de 590 nm. En todos los ensayos probados, solo los anticuerpos biespecíficos que se dirigen al dominio I de HER2 pudieron inhibir la proliferación en presencia de una concentración alta de heregulina (Figura 28).

Combinaciones de fármacos con PB4188 in vitro.

Para investigar la posibilidad de combinar PB4188 con fármacos de molécula pequeña, se combinó PB4188 con fármacos que interfieren en diferentes niveles de la ruta de PI3K o MAPK. Además, se probó la combinación con fármacos quimioterapéuticos e inhibidores de ciclina. Las combinaciones se probaron en células que sobreexpresan HER2 que crecen en presencia de HRG en matrigel (SK-BR-3 y BT-474) o en presencia de concentraciones de estrés de HRG (N87 y SK-BR-3 como se describe en ensayos de proliferación). El efecto inhibitorio de las combinaciones de fármacos se probó mediante formación de imágenes o midiendo la proliferación usando Alamar Blue como se describe aquí anteriormente. Primero, se determinó el EC₂₀ PB4188 y los fármacos probados. A continuación, se realizaron titulaciones en forma de tablero de ajedrez con PB4188 y los fármacos. Se observaron sinergias en todas las líneas celulares probadas con inhibidores de tirosina quinasa (afatinib, lapatinib, neratinib), el inhibidor de PI3Kα BYL719, el inhibidor de Akt MK-2206, el inhibidor de mTOR everolimus, el inhibidor de Src saracatinib, el fármaco disruptor de microtúbulos paclitaxel y el Vorinostat inhibidor de HDAC (que está mal escrito en la Figura 40 como "voronistat"). La Figura 29 muestra un ejemplo de la combinación sinérgica de PB4188 con lapatinib en células SKBR-3 cultivadas en matrigel que da como resultado cambios morfológicos y reducción del crecimiento celular. Se calculó el grado de inhibición del crecimiento obtenido con cada combinación. El cambio de potencia se puede demostrar usando isoblogramas (Greco et al 1995) que muestran cuánto menos fármaco se requiere en una combinación para lograr el nivel deseado en comparación con el agente único requerido para alcanzar ese efecto. Los valores de inhibición de los experimentos de combinación fueron utilizados por el software CHALICETM Analyzer para generar los isoblogramas. Los isoblogramas de las diferentes combinaciones de fármacos en células amplificadas con HER2 se muestran en la Figura 40. El análisis de isoblograma indicó que PB4188 mostró combinaciones de fármacos sinérgicas con afatinib, lapatinib, neratinib, BYL719, MK-2206, everolimus, saracatinib, vorinostat y paclitaxel.

Estos datos demuestran que los fármacos que actúan sobre la ruta de PI3K son particularmente eficaces en combinación con PB4188. Además, las combinaciones con inhibidores de tirosina quinasa son eficaces. Además, una combinación con el fármaco de crecimiento y migración/invasión saracatinib puede ser favorable en el contexto metastásico.

5 PB4188 Inhibición de la fosforilación in vitro

- Se recolectaron células de un cultivo desarrollado exponencialmente y se sembraron en placas de 6 pozos (3.75×10^6 células para N87 y 1.5×10^6 células para SKBR-3) en medio de inanición (células N87: RPMI-1640, 0.05% BSA, 10 $\mu\text{g/ml}$ Holo-transferrina; células SKBR-3: DMEM/F-12, L-glutamina 2 mM, BSA al 0.05%, Holo-transferrina 10 $\mu\text{g/ml}$) y se incubaron durante la noche a 37°C , 5% de CO_2 , en 95% de humedad relativa. Al día siguiente, se añadieron anticuerpos a una concentración final de 5 nM y las células se incubaron durante una hora a 37°C , CO_2 al 5%, en una humedad relativa del 95%. Luego se añadió HRG hasta una concentración final de 100 ng/ml. Después de 1, 3, 6 o 24 horas a 37°C , 5% de CO_2 , en 95% de humedad relativa, las placas se colocaron en hielo, las células se lavaron dos veces con PBS frío. Posteriormente se añadieron 0.3 ml de regulador de lisis enfriado con hielo (señalización celular RTK No. 9803 o IC No. 7018) y las células se lisaron durante un mínimo de 30 minutos en hielo. A continuación, se midieron las concentraciones de proteína usando BCA (Pierce #23235). Las concentraciones de proteína se ajustaron a 2 mg/ml con regulador de lisis. A continuación, los lisados se aplicaron a matrices de anticuerpos de señalización PathScan RTK (señalización celular #7949) o matrices de anticuerpos de señalización intracelular PathScan. Todas las incubaciones se realizaron con pozos sellados en un agitador orbital a temperatura ambiente. Los lisados (75 μl) se diluyeron 2 veces a una concentración de 0.8 mg/ml con 75 μl de Regulador Diluyente Array complementado con un cóctel inhibidor de proteasa y se mantuvieron en hielo. Los pozos de la matriz se bloquearon con 100 μl de regulador de bloque de matriz durante 15 minutos. Se eliminó el regulador de bloqueo y se aplicaron lisados a los pozos y se dejaron incubar durante 2 horas. Se aspiró el lisado y los pozos se lavaron 4 veces con 100 μl de regulador de lavado. A continuación, se añadieron 100 μl de cóctel de anticuerpos de detección por pozo y se incubó durante 1 hora. Se aspiró el cóctel de anticuerpos y los pozos se lavaron 4 veces con 100 μl de regulador de lavado. Se añadieron 75 μl de estreptavidina Dylight80™ a cada pozo. Se aspiró estreptavidina Dylight80™ y los pozos se lavaron 4 veces con 100 μl de regulador de lavado. Se retiró la junta múltiple y se lavaron los portaobjetos durante 10 segundos en 10 ml en agua desionizada. Los portaobjetos se dejaron secar y se procesaron para la formación de imágenes en un Odyssey®Clx. La intensidad de la fluorescencia puntual se calculó utilizando el software Image Studio.
- En N87 y SKBR-3, PB4188 bloquea completamente la fosforilación de AKT durante las primeras 6H de incubación, en contraste con la combinación de trastuzumab + pertuzumab. Además, se observa una fuerte inhibición en la fosforilación de ERK y S6 en contraste con la combinación de trastuzumab + pertuzumab. PB4188 no inhibe la fosforilación de HER2 (Figura 30).

Análisis por inmunoprecipitación Western

- Para verificar la inhibición de la fosforilación observada en las matrices de RTK y Pathscan intracelular, se realizaron transferencias por inmunotransferencia Western de células tratadas con PB4188, la combinación de pertuzumab y trastuzumab y un anticuerpo de control en presencia de concentraciones de estrés de HRG. Se recolectaron células de un cultivo desarrollado exponencialmente y se sembraron en placas de 10 cm (20×10^6 células para N87 y 7×10^6 células para SKBR-3) en medio de inanición (células N87: RPMI-1640, 0.05% BSA, 10 $\mu\text{g/ml}$ de holo-transferrina; SKBR-3 células: DMEM/F-12, L-glutamina 2 mM, BSA al 0.05%, Holo-transferrina 10 $\mu\text{g/ml}$). Al día siguiente, se agregaron anticuerpos a una concentración final de 5 nM y las células se incubaron durante una hora. Luego se añadió HRG hasta una concentración final de 100 ng/ml. Después de 1, 3, 6 o 24 horas, las placas se colocaron en hielo, las células se lavaron dos veces con PBS frío, se transfirieron a tubos Eppendorf y se lisaron con 250 μl de regulador de lisis RIPA (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Na2EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 1%, SDS al 0.1%, pirofosfato de sodio 2.5 mM, beta-glicerofosfato 1 mM, Na3VO4 1 mM, leupeptina 1 $\mu\text{g/ml}$). Se dejó que la lisis procediera durante 30 minutos en hielo. Los lisados celulares se centrifugaron y los sobrenadantes se recogieron en nuevos tubos Eppendorf. La concentración de proteínas se determinó mediante el método BCA (Pierce). Se separaron 30 μg del lisado en un gel Bis-Tris NuPage al 4-12% (Invitrogen) y las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante una hora con TBS-T que contenía un 5% de BSA y se tiñeron con los anticuerpos indicados según las instrucciones del fabricante (Cell Signaling Technology). A continuación, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con HRP, se incubaron con sustrato ECL y se sometieron a autorradiografía usando películas de rayos X (Amersham). Todos los anticuerpos de detección fueron de la tecnología de señalización celular: Phospho-Akt (ser 473) #4060, Total Akt #4691, Phospho-HER2 (Tyr 1221/1222) #2243, Total HER2 #2242, Phospho-HER3 (Tyr 1289) #4791, Total HER3 #4754, Phospho-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) #4377, Total ERK1/2 #4695, Phospho-S6 RP (Ser 235/236) #2211, Total S6 RP #2217, Anti- conejo #7074 ligado a HRP. Los resultados muestran que PB4188 muestra una inhibición prolongada de la fosforilación de HER3 que da como resultado la inhibición de la ruta de las quinasas MAPK y PI3 con un efecto profundo sobre la inhibición de la fosforilación de AKT (Figura 31).

Farmacodinamia in vivo de PB4188

- 60 Análisis de fosfoproteínas por Lumines

Los tumores (100 mm³) de ratones trasplantados con JIMT-1 tratados con 2 dosis de PB4188 y 4 dosis de PB4188 se eliminaron 24 horas después de la dosificación. Los tumores se congelaron instantáneamente y se procesaron hasta convertirlos en polvo. Los lisados tumorales se prepararon a una concentración de 50 mg de tumor/ml usando regulador de lisis BioRad frío (suplementado con 0.4% BioRad Factor 1, 0.2% BioRad Factor 2 y 2 mM PMSF) a las muestras de polvo congelado, incubadas a 4°C en un agitador oscilante durante 60 minutos para asegurar una lisis completa. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 16000 x g y se dividieron en alícuotas. La proteína total se determinó usando los reactivos de ensayo de proteína Biorad DC de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Ensayo Luminex: Las muestras de lisado tumoral JIMT-1 se procesaron y analizaron para: AKT total AKT (Ser473) y AKT (Thr308 usando kits Luminex disponibles comercialmente de Millipore (Cat #48-618MAG (Lot No. 2532050), 46-645MAG (Lot No. 46645M-1K). Cada muestra se analizó por duplicado. Se prepararon diluciones en diluyente de muestra para cargar una diana de aproximadamente 25 µg de proteína por pozo para todas las determinaciones de analito total y fosforilado. Los kits Millipore se utilizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Los tumores tratados con PB4188 mostraron un aumento en la expresión de Akt en comparación con los tumores no tratados. PB4188 inhibió completamente la fosforilación de AKT, tanto después de una dosis de dos semanas como después de una dosis de cuatro semanas (Figura 32).

Análisis de fosfoproteínas por ensayo VeraTag

Se extrajeron los tumores (100 mm³ o 400 mm³) de ratones trasplantados con JIMT-1 tratados con 1 o 2 dosis de PB4188 y se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%. Los ratones que tenían tumores de 100 mm³ se sacrificaron 24 horas después de una dosis única de PB4188 (25 mg/kg) mientras que los ratones que tenían tumores de 400 mm³ recibieron 2 dosis semanales de 25 mg/kg y se sacrificaron 4 horas después de la dosificación. A continuación, las muestras se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de 7 µm de espesor con un micrótopo (LEICA) y se colocaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente (VWR) con el número de serie marcado. Los portaobjetos se secaron al aire durante 30 minutos y luego se hornearon en un horno calentado a 60°C. Las siguientes muestras se procesaron para diferentes análisis VeraTag. Análisis de HER2 total (HT2) de acuerdo con la solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 12/340,436, análisis de HER3 total (H3T) según la Patente Estadounidense No. 8,349,574; Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2013/0071859 y finalmente heterodímero HER2-HER3 (H23D), HER3pY1289 (H3pY1289) y quinasa HER3-PI3 (H3PI3K) según la Solicitud de Patente Internacional. No. PCT/US2014/033208. En ambos regímenes de dosificación, se hizo evidente una reducción significativa mediada por PB4188 en los dímeros HER2:HER3 en comparación con los controles no tratados. No se observaron diferencias en el total de HER2, HER3 o HER3 fosforilado entre los tumores tratados con PB4188 y los controles. Los tumores que se analizaron 4H después de la dosificación de PB4188 mostraron una reducción significativa en HER3-p85 (PI3K) en comparación con los controles no tratados.

PB4188 reduce la progresión del ciclo celular en células cancerosas estimuladas por HRG

Se investigó la capacidad de PB4188 para influir en la progresión del ciclo celular en líneas de células cancerosas que expresan diversos niveles de proteína de HER2. Se sembraron células HER2+ (MCF-7), HER2+++ (células JIMT-1, SK-BR-3 y N87) en medio de ensayo (células MCF-7: RPMI-1640, 0.05% BSA, 10 µg/ml de holo-transferrina, piruvato de sodio 1 mM, MEM NEAA; JIMT-1: DMEM, 0.05% BSA, 10 µg/ml de holo-transferrina; células SK-BR-3: DMEM/F-12, 2 mM L-glutamina, 0.05% BSA, 10 µg/ml de holo-transferrina; células N87: RPMI-1640, BSA al 0.05%, 10 µg/ml de holo-transferrina). Por pozo de placa de 24 pozos, 300.000 MCF-7, o 400.000 N87 o 150.000 SK-BR-3 o 150.000 JIMT-1 o células sembradas en 1 ml de medio de ensayo e incubadas durante la noche a 37°C, 5% de CO₂, en 95 % humedad relativa. Al día siguiente, se añadieron PB4188 o pertuzumab + trastuzumab o PG3178 o PG1337 a las células en presencia de una concentración final de HRG de 1 o 100 ng/ml. Después de 24 horas (para células JIMT-1, N87 o SK-BR-3) o 48 horas (para células MCF-7) de incubación a 37°C, 5% CO₂, en 95% de humedad relativa, las células se complementaron con EdU (Concentración final de 10 µM) durante 2 horas antes de ser recolectado y teñido para la incorporación de EdU usando el kit Click-iT EdU AlexaFluor488 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (LifeTechnologies, cat.no. C10425). Al menos 30 minutos antes de analizar las células mediante citometría de flujo en FACSCanto, las células se incubaron con colorante rojo lejano FxCycle 200 nM (LifeTechnologies, n° de catálogo F10348) y 100 µg/ml de ARNasa A (LifeTechnologies, n° de cat. 12091-039). Los eventos se adquirieron en el canal AlexFluor488 (para la detección de EdU) y en el canal APC (para la tinción de ADN total con el colorante FxCycle). Los datos se analizaron seleccionando células individuales en un diagrama de dispersión de ancho FSC vs altura FSC, y subseleccionando las fases G0/G1, S y G2M del ciclo celular en un diagrama de dispersión APC vs AlexaFluor488, como poblaciones EdU^{neg}APC^{baja}, EdU^{pos} y EdU^{neg}APC^{alta}, respectivamente.

Los datos se representan como el índice de proliferación calculado dividiendo el porcentaje de células en las fases S y G2/M por el porcentaje de células en la fase G0/G1. La Figura 34 muestra que PB4188 es consistentemente más potente que PG3178 o pertuzumab + trastuzumab para inhibir la proliferación inducida por una concentración estándar (1 ng/ml) o alta (100 ng/ml) de HRG. A altas concentraciones de HRG, PB4188 todavía inhibe la progresión del ciclo celular.

PB4188 induce la internalización del receptor

Se midió el patrón de internalización de anticuerpos usando colorantes sensibles al pH. Esto se ha descrito en la técnica en el documento WO2013134686 A1 donde dichos colorantes, cuando se acoplan a un anticuerpo, muestran una señal de fluorescencia aumentada cuando se exponen a un pH más bajo. Esto ocurre cuando los anticuerpos acoplados a colorante se internalizan desde la superficie de las células diana en endosomas ligeramente ácidos (pH 6-6.5) a lisosomas ácidos (pH inferior a 5.5). Para investigar si PB4188 se internaliza en las células cancerosas, el anticuerpo se acopló al colorante del sensor de pH con un grupo reactivo de éster succinimidílico (Promega, cat. No. CS1783A01) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como comparadores, se incluyeron anticuerpos marcados con colorante anti-HER2 (trastuzumab, pertuzumab, PG3958), anti-HER3 (PG3178, #Ab6) y control negativo (anti-toxina tetánica, PG1337). Se recolectaron células cancerosas SKBR-3 y N87 que sobreexpresan HER2 de un cultivo de crecimiento exponencial y se sembraron en placas de 96 pozos (15x10³ células por pozo) en 100 µl de medio de ensayo (células N87: RPMI-1640, 0.05% BSA, 10 µg/ml Holo-transferrina; células SKBR-3: DMEM/F-12, L-glutamina 2 mM, BSA al 0.05%, Holo-transferrina 10 µg/ml) que contiene 1 ng/ml de HRG e incubadas durante la noche a 37°C, 5% de CO₂, en 95% de humedad relativa. Al día siguiente, se añadieron 20 µl de anticuerpos marcados con colorante sensibles al pH para alcanzar una concentración final de 100 nM y las células se incubaron durante la noche a 37°C, CO₂ al 5%, en una humedad relativa del 95%. Al día siguiente, las células se recolectaron recolectando células no adherentes y tripsinizando las células adherentes. Después de lavar las células con regulador FACS (PBS 0.5% BSA azida de sodio 0.1%), las células se tiñeron con IgG antihumana marcada con APC (Jackson Immunoresearch, No. de cat. 109-136-098, dilución 1:100). Las células se analizaron mediante citometría de flujo en FACSCanto (BD Biosciences) midiendo las intensidades de fluorescencia media (MFI) de los canales de PE y APC para determinar la internalización y la unión superficial residual de los anticuerpos, respectivamente. Los datos que se muestran en la Figura 35 muestran que el PB4188 se internaliza en la misma medida que el trastuzumab, mientras que la combinación de trastuzumab + pertuzumab conduce a una mayor internalización. La combinación de trastuzumab + pertuzumab reduce la ADCC en comparación con trastuzumab solo (Figura 36). Por lo tanto, se prevé que el nivel de internalización de PB4188 no afecta la potencia de ADCC.

Generación y caracterización de variantes del anticuerpo anti-HER3 3178

Se diseñaron variantes del anticuerpo anti-HER3 MF3178 con el objetivo de mejorar las propiedades del anticuerpo. Se introdujeron mutaciones en la región 1 del marco del gen VH (FR1), la región determinante de complementariedad 1 (CDR1), FR2, CDR2 y/o FR3, mientras que CDR3 y FR4 no se modificaron. El diseño incluyó, pero no se limitó a, mutaciones que se introdujeron para eliminar motivos de modificación postraducción (PTM) (por ejemplo, cambiando el motivo de desamidación NS a NQ), para reducir la hidrofobicidad de la superficie (por ejemplo, cambiando I a T) o para aumentar el punto isoeléctrico (pI; por ejemplo, cambiando Q por K). Las 20 variantes (Ver Figura 37) se expresaron como anticuerpo biespecífico combinado con un brazo de Toxoide Tetánico (TT) y se probaron en el ensayo funcional MCF-7 y las 20 variantes tenían una potencia similar a la del anticuerpo MF3178 en este formato. Las 20 variantes también se probaron en este formato en FACS en una titulación para la unión a MCF-7 y todas las variantes tenían perfiles de unión muy similares, lo que sugiere que las afinidades de todas las variantes son similares. Se seleccionaron tres variantes principales MF6058, MF6061 y MF6065 para experimentos adicionales que contienen diez, tres y siete mutaciones de aminoácidos, respectivamente (véanse las secuencias en la Figura 16E y la Figura 37). Las correspondientes IgG1 PG6058, PG6061 y PG6065 mono-específicas se produjeron y purificaron a gran escala. Como se muestra en la Figura 38, la actividad inhibidora de las tres variantes en el ensayo de proliferación de la línea celular N87 dependiente de HRG es similar a la de PG3178. El perfil CIEX-HPLC de las tres variantes fue similar al de PG3178 con respecto a la heterogeneidad de carga, así como el ancho y la simetría del pico, como se muestra en la Figura 39. El tiempo de retención (tR) del pico principal se correlacionó aproximadamente con el pI de los anticuerpos, es decir, un pI más alto dio como resultado un tiempo de retención más largo. En el diseño de anticuerpos biespecíficos o mezclas de anticuerpos, la selección de variantes de anticuerpos con tR óptimo es valiosa, ya que se puede facilitar la purificación de los componentes de anticuerpos deseados utilizando CIEX.

Títulos séricos de las diferentes cohortes de ratones inmunizados determinados por FACS. D=día de la determinación del título de anticuerpos. Tabla 1: respuesta frente a HER2. Tabla 2: respuesta frente a HER3. Se indican las líneas celulares utilizadas (MCF7, SKBR3, BT474). Los diferentes ratones están en las columnas.

Tabla 1, respuesta anti-HER2

ErbB2	K562					MCF7					SKBR3					BT474								
A, D35	236	168	315	148	116	145	5909	5728	6162	5481	4838	4930	57738	29527	35185	44737	33502	38355	38701	18378	27510	24793	37659	3271
C, D42	163	144	154	152	166		2574	3212	2140	2346	2172		15438	17185	1267	12410	12061		10250	9665	7388	6618	6030	
E, D35	129	134	152	132	147	157	6213	5542	5625	5634	4812	3905	27720	19151	20863	26712	19478	13966	22710	17413	19119	3217	18187	3778
G, D52	145	129	126	133	163		5752	5088	4268	4899	5240		32764	26517	31026	14659	15743		19413	16608	26426	14369	18613	
	Averag e D0						Averag e D0						Averag e D0						Averag e D0					
	130.8						194.4						300.2						241					
	5x						5x						5x						5x					
	654						477.2						1503						1205					
	10x						1941						3002						10x					
	20x						3889						6004						20x					
	30x						5815						9609						30x					

Tabla 2, respuesta anti-HER3

ErbB3	K562						MCF7						SKBR3					BT474						
B, D56	332	336	453	535	417	645	1630	1236	3251	1401	1297	1814	1666	1100	3072	1199	1268	1503	1675	1204	3393	1380	1295	1725
D, D56	336	445	277	185	319		1159	3260	959	643	2362		964	2180	721	510	1577		1030	3754	945	584	2042	
F, D35	265	245	249	285	291	262	4370	3925	3445	3428	3575	2718	4135	3275	2676	2659	2674	2414	4518	3690	3522	3144	3208	2776
H, D52	263	289	233	271	242		4083	4238	2970	4157	4384		5133	4318	3256	1608	3474		6325	4310	4542	6653	6333	
	Avera						Avera						Avera						Avera					
	ge D0	130					ge D0	172					ge D0	200					ge D0	222				
	2.5x	326					2.5x	430					2.5x	501					2.5x	556				
	5x	651					5x	859					5x	1002					5x	1112				
	10x	1303					10x	1718					10x	2004					10x	2223				
	20x	2605					20x	3437					20x	4008					20x	4446				

Tabla 3

- 5 Unión de anticuerpos HER2 dependiendo de su reactividad con quimeras de HER2 de pollo-humano y reactividad con HER2 de ratón. "Número" indica el número de anticuerpos únicos en cada grupo

Grupo	Reactividad de dominio	Número
1	Dominio I específico	25
2	Dominio II específico	2
3	Dominio III específico	23
4	Dominio IV específico	7
5	Dominio IV específico + reactivo cruzado	2
6	Reactivo a todos los constructos	2
7	Solo reactivo al HER2 humano	4

Tabla 4

- 10 ELISA de competición con IgG y anticuerpos fago. Se utilizan cuatro anticuerpos IgG en el ensayo de competición: dos anticuerpos HER2 que reconocen el dominio IV (trastuzumab y PG1849); un anticuerpo que reconoce el dominio II (PG2971) y un anticuerpo anti-RSV de control negativo. Se observa pérdida de señal cuando compiten el fago y el anticuerpo codificados por los mismos genes de región variable; es decir, MF1849 y PG1849 y MF2971 y PG2971.

	-	MF1849	MF2971	MF2708
Trastuzumab	0.046	1.02	1.115	0.044
PG1849	0.043	0.384	1.139	0.041
PG2971	0.042	1.202	0.091	0.042
Anti-RSV mAb	0.044	0.94	1.003	0.047
-	0.045	1.432	1.481	0.038

Tabla 5

- 15 Unión de anticuerpos HER3 dependiendo de su reactividad con quimeras de HER2 de rata-humano y reactividad con HER3 y HER3 de otras especies. "Número" indica el número de anticuerpos únicos en cada grupo.

Grupo	Reactividad	Número
1	Alta reactividad de dominio III, reactividad de rata y ratón y reactividad menor al dominio IV	8

2	Alta reactividad de dominio III, rata, humanos y cinoreactiva, reactividad menor al dominio IV	8
3	Reactividad a HER3 de rata, cyno y humano	43
4	Reactivo al HER3 humano	32
5	Reactivo a todos los constructos	33

Tabla 6

Actividad funcional de los HER2 monoclonales más potentes a 1 ug/ml de IgG. Porcentaje de actividad en comparación con los anticuerpos de referencia, es decir, trastuzumab en SKBR-3 y #Ab6 en MCF-7. Para anticuerpos HER2, los dominios de todos los anticuerpos excepto PG2926 se asignaron a los dominios I, III o IV.

5

PG ID nr	Diana	Contenedor de epítomos	Dominio HER2	SKBR-3	MCF-7
PG2916	HER2	1	I	58%	30%
PG2973	HER2	1	I	49%	58%
PG3004	HER2	1	I	49%	56%
PG1849	HER2	5	IV	42%	22%
PG3025	HER2	1	I	38%	28%
PG2971	HER2	1	I	25%	51%
PG3031	HER2	1	I	33%	38%
PG2926	HER2	7	NA	0%	35%
PG2930	HER2	3	III	0%	7%

Tabla 7

Actividad funcional de los HER3 monoclonales más potentes a 1 ug/ml de IgG en un ensayo de MCF-7 dependiente de HRG. Porcentaje de actividad en comparación con los anticuerpos de referencia # Ab6.

PG ID nr	Objetivo	Grupo de epítomos	MCF-7
PG3178	HER3	5	162%
PG3163	HER3	5	119%
PG3176	HER3	5	68%
PG3099	HER3	5	ND

10

Tabla 8

Tinción FACS de anticuerpos HER2 mediante la cual HER2 VH se combina con una cadena liviana diferente a la cadena liviana común indicada en la Figura 16. MFI indica la intensidad de fluorescencia media en FACS. El número de HER2 MF se indica entre paréntesis, los clones de unión a HER2 en el contexto de las diferentes cadenas livianas se indican en gris.

	MFI	MFI
Número de PG	Células K562 (control neg)	K562 HER2
PG4462 (MF2971)	267	14900
PG4463 (MF3958)	248	15600
PG4474 (MF2916)	254	14700

PG4478 (MF2973)	254	18000
PG4481 (MF3004)	267	16200
PG4482 (MF3025)	299	12000
PG4483 (MF3031)	260	14900
PG4465 (MF1849)	270	249
Anti-HER2 mAb	309	7618
Anti-RSV mAb	263	276

Tabla 9

Actividad funcional de los anticuerpos biespecíficos HER2 x HER3 guía (indicados mediante el prefijo PB; cada PB comprende un brazo HER2 y un brazo HER3 como se indica en la tabla) en comparación con los anticuerpos comparadores en los ensayos MCF-7 y BxPC3 dependientes de HRG. Basándose en los perfiles de unión que utilizan constructos quiméricas, los anticuerpos HER2 y HER3 podrían separarse en diferentes contenedores. Para los anticuerpos HER2, los dominios, todos los anticuerpos, excepto PG2926, podrían mapearse en los dominios I, III o IV.

Nombre	Brazo HER2	dominio HER2	brazo HER3	Unión de HER3	MCF-7	BxPC3
					IC50 (pM)	% de inhibición
PB3441	2926	NA	3178	5	51,7	-24%
PB3443	2930	III	3178	5	136	-31%
PB3448	1849	IV	3178	5	371	-22%
PB3565	2973	I	3178	5	30,9	-19%
PB3566	3004	I	3178	5	7,9	-20%
PB3567	2971	I	3178	5	46,5	-17%
PB3709	3025	I	3178	5	34,5	-19%
PB3710	2916	I	3178	5	74,2	-19%
PB3883	2971	I	3176	5	113	-19%
PB3986	3025	I	3163	5	30,7	-21%
PB3990	2971	I	3163	5	13	-18%
PB4011	2971	I	3099	3	40,2	ND
PB3437	3031	I	3178	5	14	-10%
PG3178	NA	NA	3178	5	139	-17%
#Ab6					504	-7%
trastuz. + pertuz.					352	ND
trastuzumab					500	-3%

Tabla 10

Afinidades de unión monovalente de PB4188 y PB3448 por HER2 y HER3 medidas en Biacore. Ambos anticuerpos biespecíficos comparten el mismo brazo de HER3, ND, no hecho.		
PB	KD en Her2 (nM)	KD en Her3 (nM)
PB3448	5.4*	ND
PB4188	0.16*	3.9

Tabla 11

Grupos de tratamiento del estudio de xenoinjerto JIMT-1						
Gr.	N	Régimen 1				
		Agente	Vehículo	mg/kg	Ruta	Programación
1 [#]	10	PBS	X	-	ip	qwk x 4 (comienza el día 1)
2	10	lapatinib	-	150	po	qd x 28 (comienza el día 1)
3	10	PB4188	-	2.5	ip	qwk x 4 (comienza el día 1)
4	10	PB4188	-	25	ip	qwk x 4 (comienza el día 1)
5	10	Pertuzumab + Trastuzumab	-	2.5	ip	qwk x 4 (comienza el día 1)
6	10	Pertuzumab + Trastuzumab	-	25	ip	qwk x 4 (comienza el día 1)

Tabla 12.

Afinidades de IgG HER2xHER3 IgG (PB4188) marcada con ¹²⁵ I, HER3xTT (PB9215), HER2xTT (PB9216) y Herceptin (monoespecífico para HER2), determinadas mediante mediciones de afinidad celular en estado estable con células BT-474 y células SK-BR-3. Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes.		
	BT-474	SK-BR-3
Herceptin	3.7 ± 0.5 nM	1.3 ± 0.1 nM
PB4188	3.2 ± 0.5 nM	2.0 ± 0.4 nM
HER2xTT	3.9 ± 0.6 nM	2.3 ± 0.7 nM
HER3xTT	0.23 ± 0.08 nM	0.99 ± 0.4 nM

5

Tabla 13. Las reactividades (y rangos) de las proteínas de unión medias enumeradas para todos los residuos críticos identificados. Los residuos críticos implicados en la unión de PG3958Fab se identificaron como aquellos mutados en clones que eran negativos para la unión de PG3958Fab (<35% WT) pero positivos para la unión de mAb 1129 de control (>80% WT). Se identificaron dos residuos críticos adicionales que no cumplían con las pautas de umbral, pero cuya mutación redujo la unión del anticuerpo en menor grado. La numeración de residuos es la de PDB ID #1S78.

10

Residuo HER2	Mutación	Unión de Fab de PG3958 % de unión en peso (rango)	Control de unión de mAb % de unión en peso (rango)	Designación
144	T144A	31.9 (11)	82.1 (13)	Crítica
166	R166A	32.2 (5)	93.7 (17)	Crítica
181	R181A	10.1 (5)	98.6 (34)	Crítica
172	P172A	52.5 (2)	94.9 (24)	Secundario
179	G179A	41.7 (18)	87.9 (25)	Secundario

Tabla 14. Se enumeran las reactividades (y rangos) de la proteína de unión media para ambos residuos críticos. Los residuos críticos implicados en la unión de PG3178 se identificaron como aquellos mutados en clones que eran negativos para la unión del mAb PG3178 (<20% WT) pero positivos para la unión del mAb de control 66223 (>70% WT). La numeración de residuos es la de PDB ID #4P59.

Residuo HER3	Mutación	Unión de PG3178 % de unión en peso (rango)	Control de unión de mAb % de unión en peso (rango)	Designación
409	F409A	16.74 (8)	79.63 (0)	Crítica
426	R426A	3.17 (5)	93.08 (36)	Crítica

5

Tabla 15. Lista de residuos expuestos dentro de un radio de 11.2 Å de Arg 426 en HER3:

Leu 423	L423
Tyr 424	Y424
Asn 425	N425
Gly 427	G427
Gly 452	G452
Arg 453	R453
Tyr 455	Y455
Glu 480	E480
Arg 481	R481
Leu 482	L482
Asp 483	D483
Lys 485	K485

Referencias

Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. 2011. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Nov 29;9(1):16-32.

- 10 Balko JM, Miller TW, Morrison MM, Hutchinson K, Young C, Rinehart C, Sanchez V, Jee D, Polyak K, Prat A, Perou CM, Arteaga CL, Cook RS. 2012. The receptor tyrosine kinase ErbB3 maintains the balance between luminal and basal breast epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. Jan 3;109(1):221-6.

- 15 Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A, Clark E, Benyunes MC, Ross G, Swain SM. 2012. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. Jan 12;366(2):109-19.

de Kruif et al. *Mol. Biol.* (1995), 248, 97-105

Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments: What the cardiologist needs to know. *Nat Rev Cardiol* 2010;7:564-75

- 20 Guarneri Jain KK, Casper ES, Geller NL, et al. A prospective randomized comparison of epirubicin and doxorubicin in patients with advanced breast cancer; *J Clin Oncol* 1985;3:818-26

Junttila TT, Akita RW, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips GD, Friedman LS, Sampath D, Sliwkowski MX. 2009. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell*. May 5;15(5):429-40.

- 25 Junttila, T. T., K. Parsons, et al. (2010). "Superior In vivo Efficacy of Afucosylated Trastuzumab in the Treatment of HER2-Amplified Breast Cancer." *Cancer Research* 70(11): 4481-4489

Merchant et al. *Nature Biotechnology*, Vol. 16 July 1998 pp 677-681

Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, Winter G. 1994. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J*. 1994 Feb 1;13(3):692-8.

- Ocana A, Vera-Badillo F, Seruga B, Templeton A, Pandiella A, Amir E. 2013. HER3 overexpression and survival in solid tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* Feb 20;105(4):266-73.
- Sergina NV, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat KM, Moasser MM. 2007. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature.* Jan 25;445(7126):437-41.
- 5 Schaefer et al. *Cancer Cell* 20, 472-486, October 2011
- Schoeberl B, Faber AC, Li D, Liang MC, Crosby K, Onsum M, Burenkova O, Pace E, Walton Z, Nie L, Fulgham A, Song Y, Nielsen UB, Engelman JA, Wong KK. 2010. An ErbB3 antibody, MM-121, is active in cancers with ligand-dependent activation. *Cancer Res.* Mar 15;70(6):2485-94.
- Shames et al. *PLOS ONE*, February 2013, Vol.8, Issue 2, pp 1-10
- 10 Tanner M, Kapanen AI, Junttila T, Raheem O, Grenman S, Elo J, Elenius K, Isola J. 2004. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2004 Dec;3(12):1585-92.
- Yarden Y, Pines G.2012. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* Jul 12;12(8):553-63.
- 15 Thery J.-C. et al., Resistance to human epidermal growth factor receptor type 2-targeted therapies, *Eur J Cancer* (2014), Vol. 50, Issue 5, pages 892-901
- Wadhwa D, Fallah-Rad N, Grenier D, et al. Trastuzumab mediated cardiotoxicity in the setting of the adjuvant chemotherapy for breast cancer: A retrospective study. *Breast Cancer Res Treat* 2009;117:357-64.
- Wehrman TS, Raab WJ, Casipit CL, Doyonnas R, Pomerantz JH, Blau HM. 2006. A system for quantifying dynamic protein interactions defines a role for Herceptin in modulating ErbB2 interactions. *Proc Natl Acad Sci USA.* Dec 12;103(50):19063-8.
- 20 Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman J, Ribas A, Li J, Moffat J, Sutherlin DP, Koeppen H, Merchant M, Neve R, Settleman J. 2012. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature.* Jul 26;487(7408):505-9.
- Yonesaka et al., *Sci.transl.Med.*, Vol.3, Issue 99 (2011); pp1-11
- 25 Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI. 2007. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest.* Aug;117(8):2051-8.
- Greco, Bravo, Parsons (1995) The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev* 47 (2): 331-85.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une al dominio III de ErbB-3, donde el anticuerpo puede reducir una función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 en una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3, en donde la composición farmacéutica comprende Histidina 5-50 mM, Trehalosa 100-300 mM, Polisorbato20 0.1-0.3 g/L o una combinación de los mismos.
2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo puede reducir el crecimiento inducido por ligando de una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3.
3. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha célula es una célula MCF-7, una célula SKBR-3, una célula NCI-N87, una célula BxPC-3, una célula BT-474 o una célula JIMT-1.
4. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el segundo sitio de unión al antígeno interfiere con la unión de un ligando ErbB-3 a ErbB-3.
5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une a ErbB-3, en donde la afinidad (KD) de dicho segundo sitio de unión al antígeno para una célula ErbB-3 positiva es igual o mayor que la afinidad de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula ErbB-2 positiva.
6. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo puede reducir una función del receptor inducida por ligando de ErbB-3 en una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3, y/o, en donde el anticuerpo puede reducir el crecimiento inducido por ligando de una célula positiva para ErbB-2 y ErbB-3.
7. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la afinidad (KD) de dicho segundo sitio de unión al antígeno por una célula positiva para ErbB-3 es menor o igual a 2.0 nM, y/o en donde la afinidad (KD) de dicho primer sitio de unión al antígeno por una célula positiva para ErbB-2 es menor o igual a 5.0 nM.
8. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la afinidad (KD) de dicho anticuerpo biespecífico por las células BT-474 es menor o igual a 5.0 nM, y/o en donde la afinidad de dicho anticuerpo biespecífico por las células SK-BR-3 es menor o igual a 5.0 nM.
9. Una composición farmacéutica acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicha célula positiva para ErbB-3 y/o dicha célula positiva para ErbB-2 es una célula BT-474 o una célula SK-BR-3.
10. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende un sitio de unión al antígeno que se une al menos a un aminoácido del dominio I de ErbB-2 seleccionado del grupo que consiste en T144, T164, R166, P172, G179, S180 y R181, y residuos de aminoácidos expuestos a la superficie que se encuentran dentro de aproximadamente 5 posiciones de aminoácidos de T144, T164, R166, P172, G179, S180 o R181, y/o, que comprenden un sitio de unión al antígeno que se une al menos un aminoácido del dominio III de ErbB-3 seleccionado del grupo que consiste en R426 y residuos de aminoácidos expuestos a la superficie que están ubicados dentro de 11.2 Å de R426 en la proteína ErbB-3 nativa.
11. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dicho anticuerpo comprende al menos la secuencia CDR3 de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-2 seleccionada del grupo que consiste en MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031 y MF3003 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, y/o, en donde dicho anticuerpo comprende al menos la secuencia CDR3 de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-3 seleccionada del grupo que consiste en MF3178; MF3176; MF3163; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o la Figura 16E o la Figura 37.
12. Una composición farmacéutica acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde dicho anticuerpo comprende al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-2 seleccionada del grupo que consiste en MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031 y MF3003 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, o donde dicho anticuerpo comprende secuencias de CDR que difieren en como máximo 3 aminoácidos de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031 o MF3003, y/o en donde dicho anticuerpo comprende al menos las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de una región variable de cadena pesada específica de ErbB-3 seleccionada del grupo que consiste en MF3178; MF3176; MF3163; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se representa en la Figura 16B o la Figura 16E o la Figura 37, o donde dicho anticuerpo comprende secuencias de CDR que difieren en como máximo 3 aminoácidos de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de MF3178; MF3176; MF3163; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061;

MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074.

5 13. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada específica de ErbB-2 seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de región variable de cadena pesada de MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031 y MF3003 como se muestra en la Figura 16A o Figura 16E, o donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que difiere en como máximo 15 aminoácidos de la secuencia de región variable de cadena pesada de MF2973, MF3004, MF3958, MF2971, MF3025, MF2916, MF3991, MF3031 o MF3003, y/o en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada específica de ErbB-3 seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de región variable de cadena pesada de MF3178; MF3176; MF3163; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 y MF6074 como se muestra en la Figura 16B o Figura 16E o Figura 37, o en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que difiere en como máximo 15 aminoácidos de la secuencia de región variable de cadena pesada de MF3178; MF3176; MF3163; MF6055; MF6056; MF6057; MF6058; MF6059; MF6060; MF6061; MF6062; MF6063; MF6064; MF 6065; MF6066; MF6067; MF6068; MF6069; MF6070; MF6071; MF6072; MF6073 o MF6074.

20 14. Una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-13, en donde dicho anticuerpo exhibe citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), y/o que está afucosilado para potenciar la ADCC.

15. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.

16. Una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-15, en donde dicho anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de inmunoglobulina diferentes con dominios de heterodimerización compatibles.

25 17. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde ambos brazos comprenden una cadena liviana común.

18. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde dicho anticuerpo comprende además un marcador.

30 19. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, que comprende un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

20. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde el pH se establece entre 5.5 y 6.5.

35 21. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde la composición farmacéutica comprende histidina 25 mM, trehalosa 220 mM, polisorbato 20 0.2 g/l o una combinación de los mismos.

22. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3.

40 23. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde dicho anticuerpo biespecífico es para uso en un sujeto que tiene una función cardíaca inferior al 90% en comparación con una función cardíaca sana.

45 24. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une al dominio III de ErbB-3 para su uso en el tratamiento de un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, en donde la composición farmacéutica comprende Histidina 5-50 mM, Trehalosa 100-300 mM, PolySorbate20 0.1-0.3 g/L o una combinación de los mismos, y en donde dicho tratamiento comprende administrar dicho anticuerpo biespecífico y al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

un inhibidor de un componente de la ruta PI3Quinasa,

un inhibidor de un componente de la ruta MAPK,

un fármaco disruptor de microtúbulos, y

50 un inhibidor de HDAC,

a un sujeto que tiene un tumor positivo para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3.

25. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une al dominio I de ErbB-2 y un segundo sitio de unión al antígeno que se une al dominio III de ErbB-3 para su uso en el tratamiento o prevención de la formación de una metástasis de una célula tumoral positiva para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3, en donde la composición farmacéutica comprende histidina 5-50 mM, trehalosa 100-300 mM, polisorbato20 0.1-0.3 g/l o una combinación de los mismos y en donde dicha célula tumoral positiva para ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/ErbB-3 tiene un nivel de expresión de heregulina que es al menos el 60% del nivel de expresión de heregulina de las células BXP3 o MCF7.
26. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22-25, en donde dicho sujeto tiene un tumor positivo para ErbB-2 o ErbB-2/ErbB-3 que tiene menos de 1.000.000 de receptores de superficie celular ErbB-2 por célula.
27. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22-26, en donde dicha célula tumoral es un cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer gastroesofágico, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas, sarcoma de células claras, cáncer de glándulas salivales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de piel o de células de melanoma.
28. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22-27, en donde dicho sujeto tiene una función cardíaca inferior al 90% en comparación con una función cardíaca sana.
29. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 23 o 28, en donde dicho sujeto sufre insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), disfunción ventricular izquierda (LVD) y/o una fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF) disminuida $\geq 10\%$, y/o en donde dicho sujeto ha tenido un infarto de miocardio.
30. Uso de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-21 para contrarrestar la fosforilación de la proteína ribosómica Akt, ERK y/o S6.

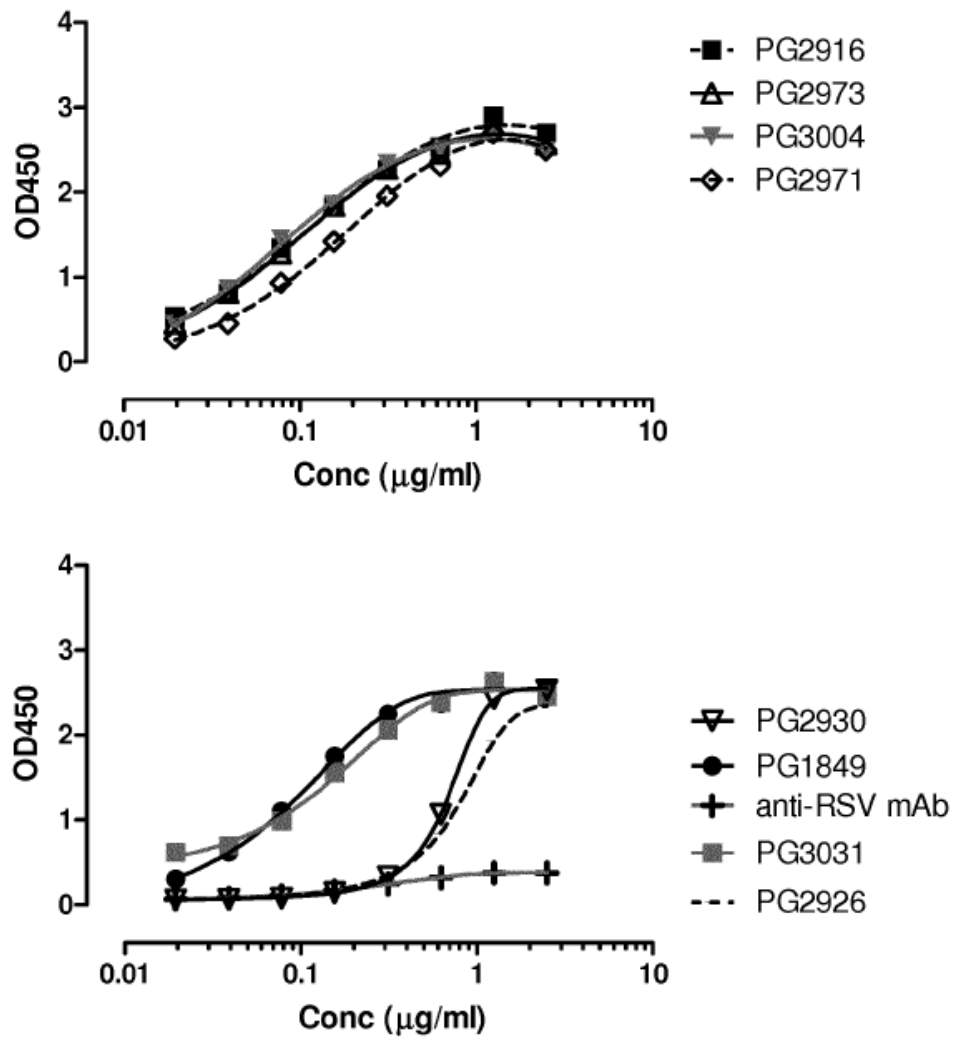


Fig. 1

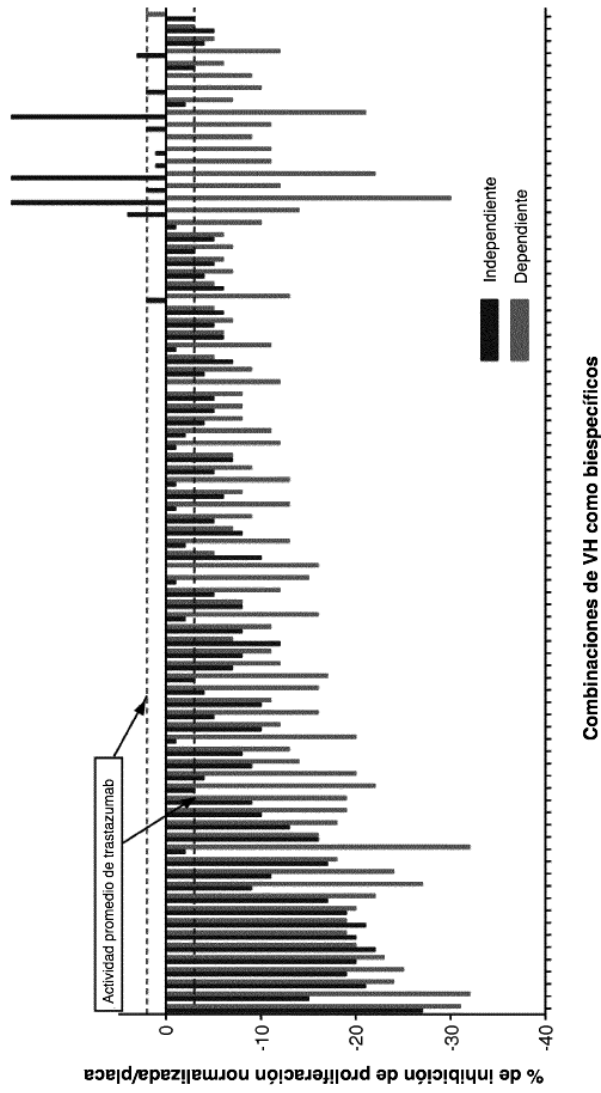


Fig. 2

Códigos PG: mAbs, códigos PB: anticuerpos biespecíficos

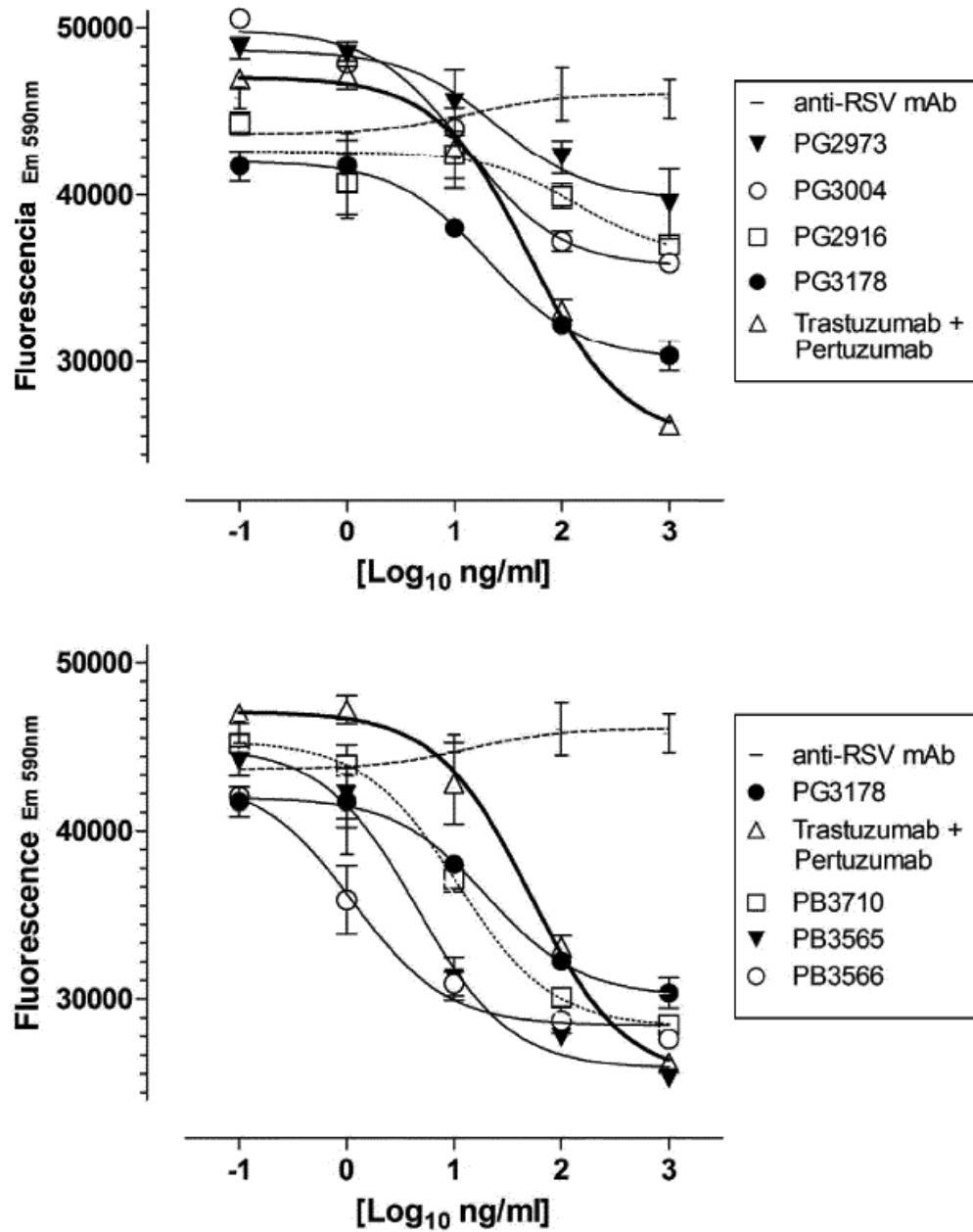


Fig. 3

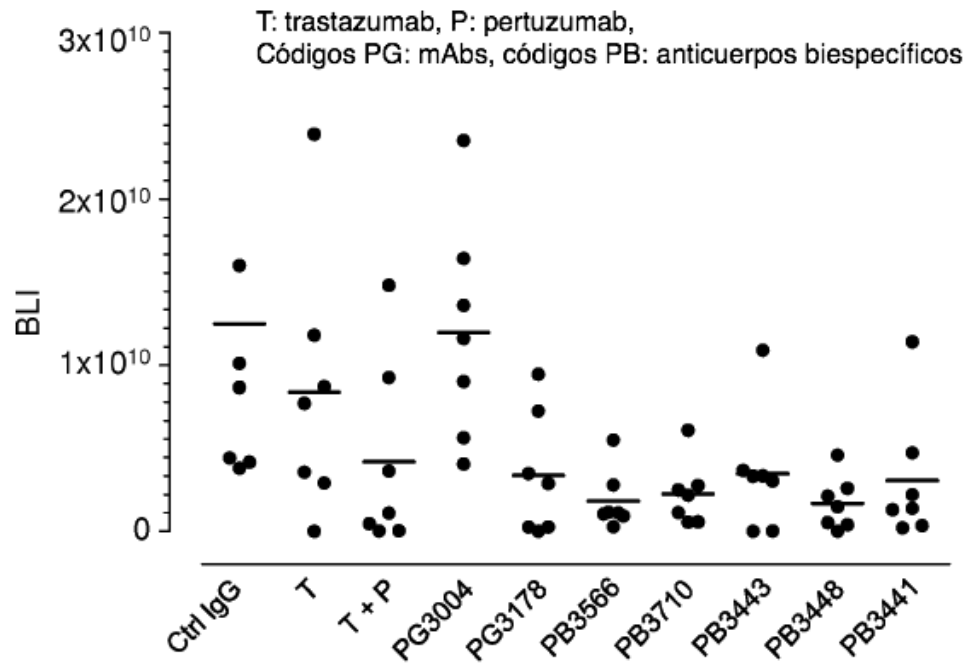


Fig. 4

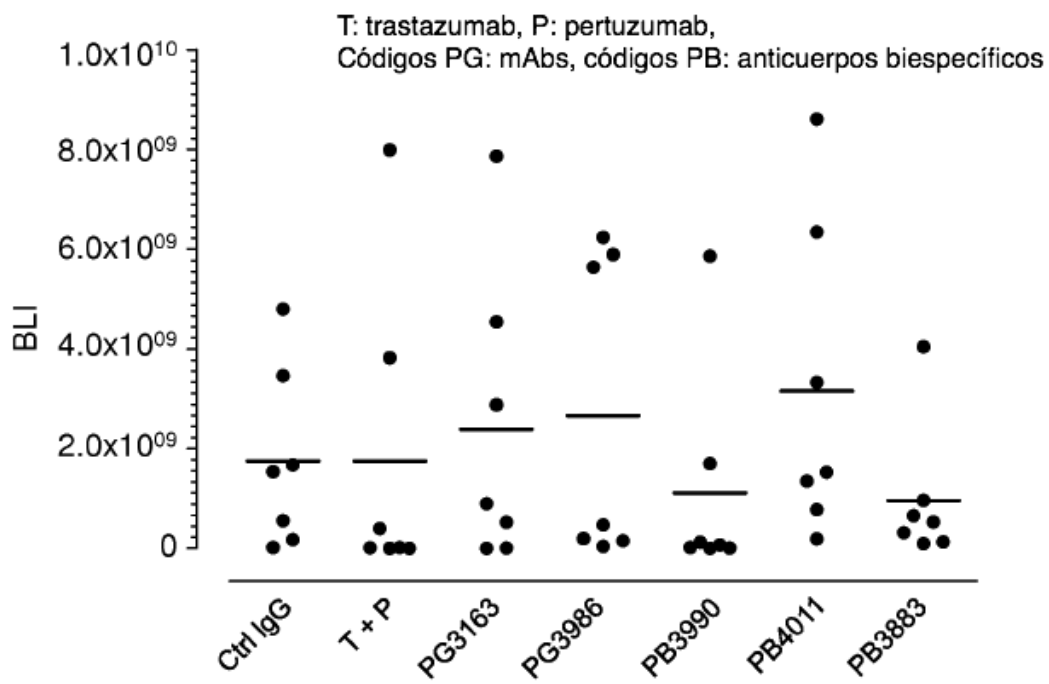


Fig. 5

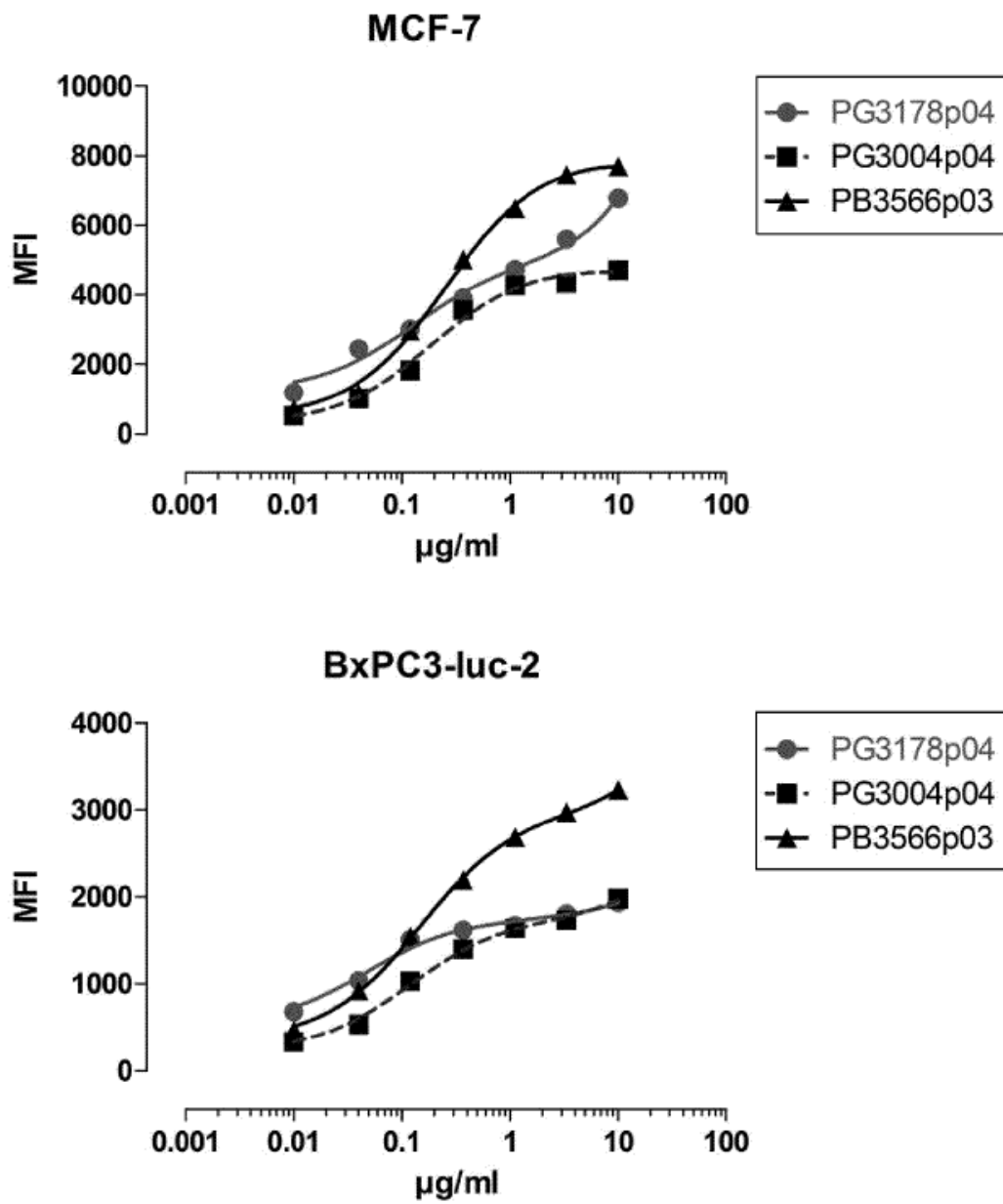


Fig. 6

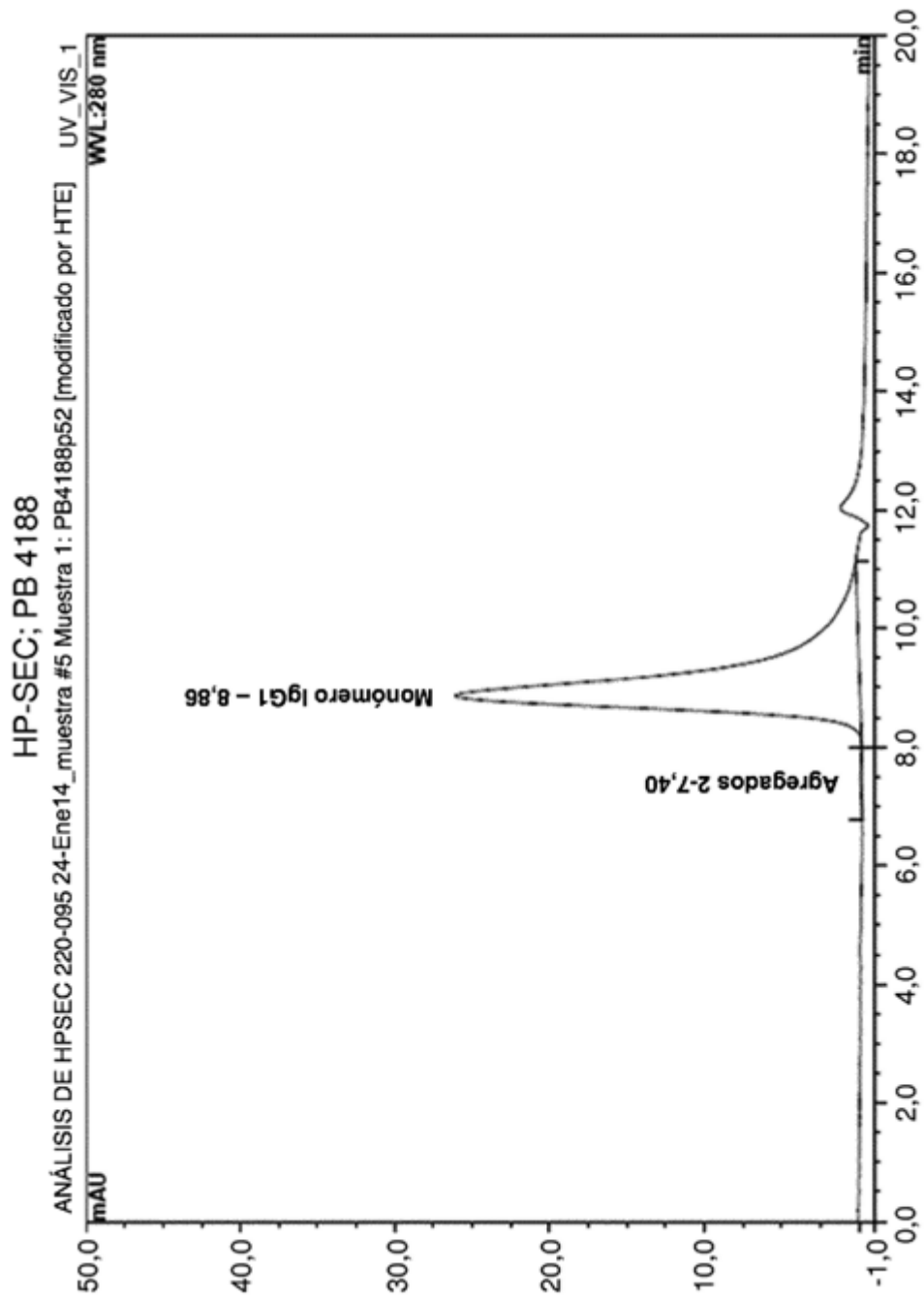


Fig. 7

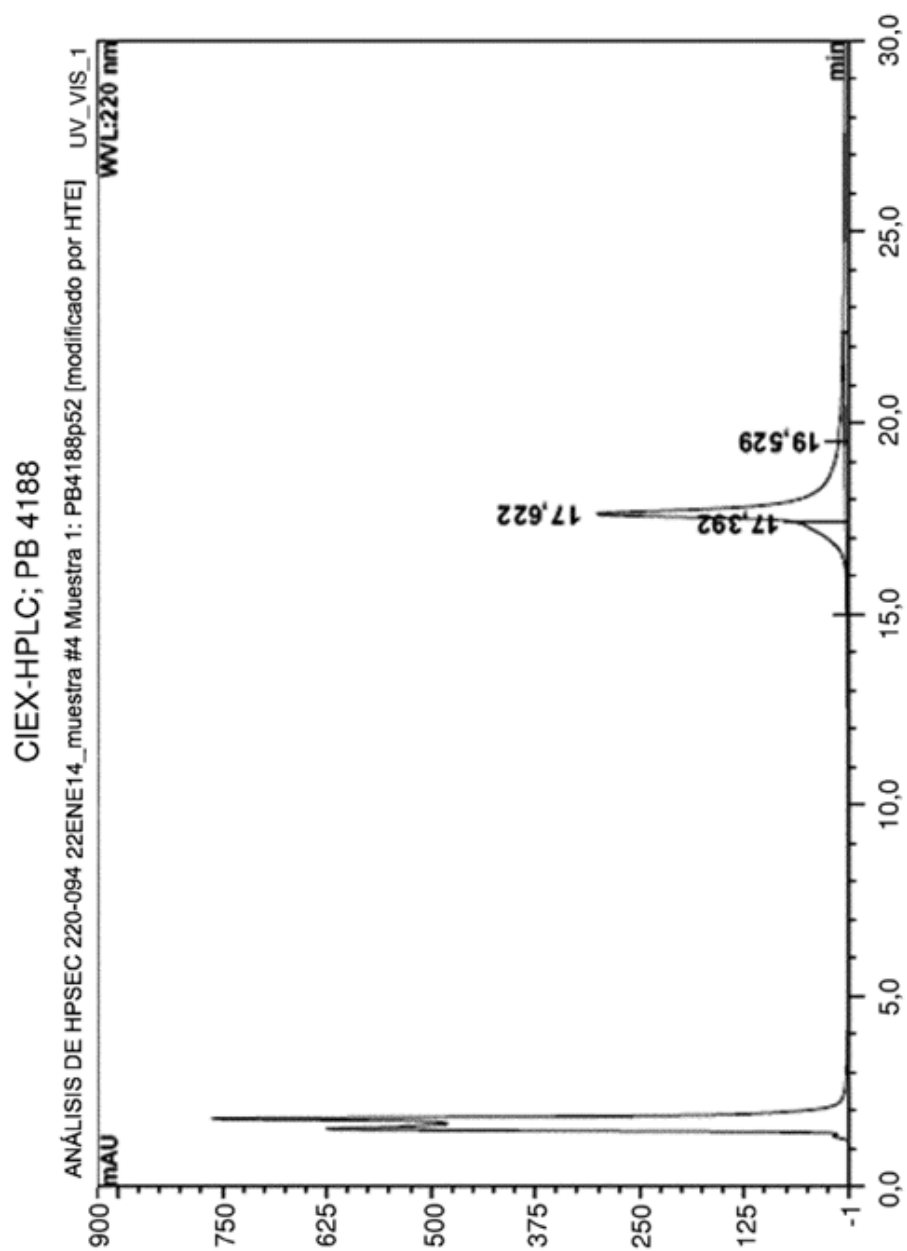


Fig. 7, Continuación

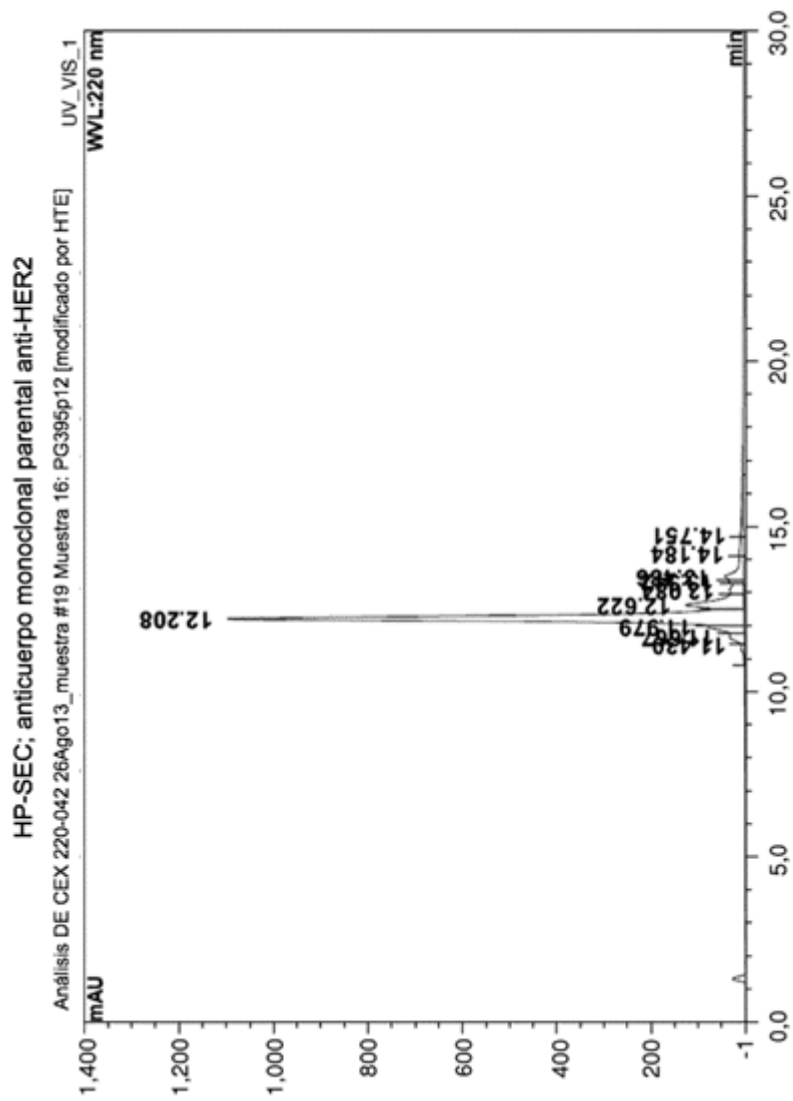


Fig. 7, Continuación

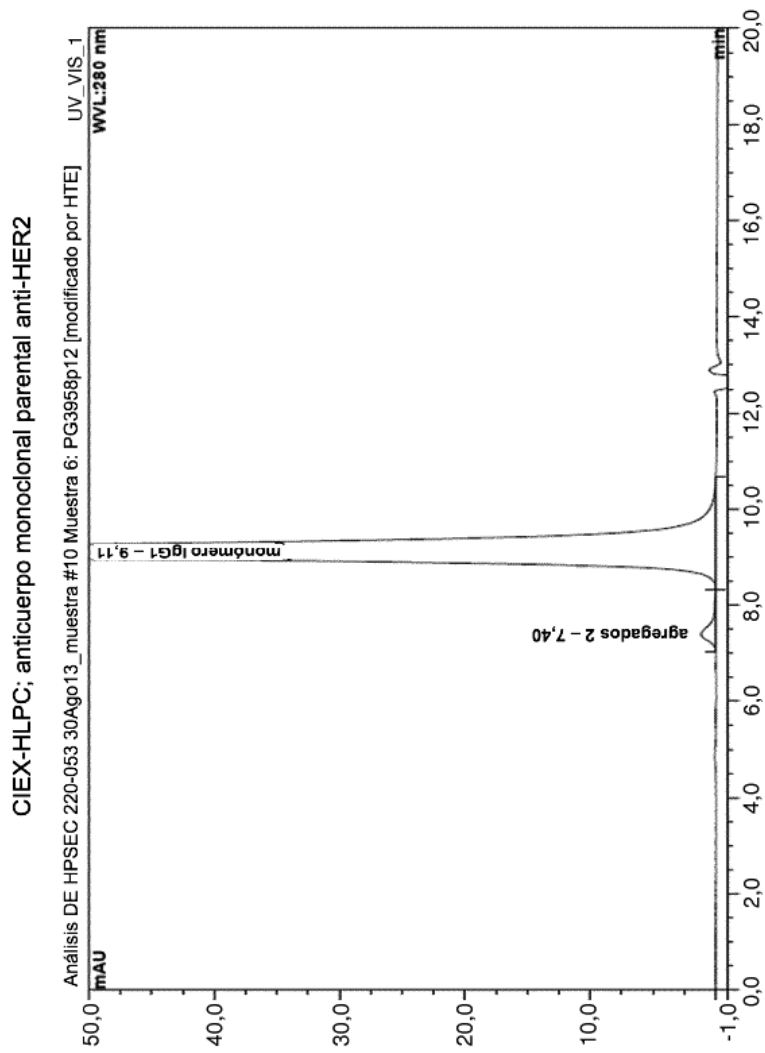


Fig. 7, Continuación

HP-SEC; referencia de IgG monoclonal anti-RSV

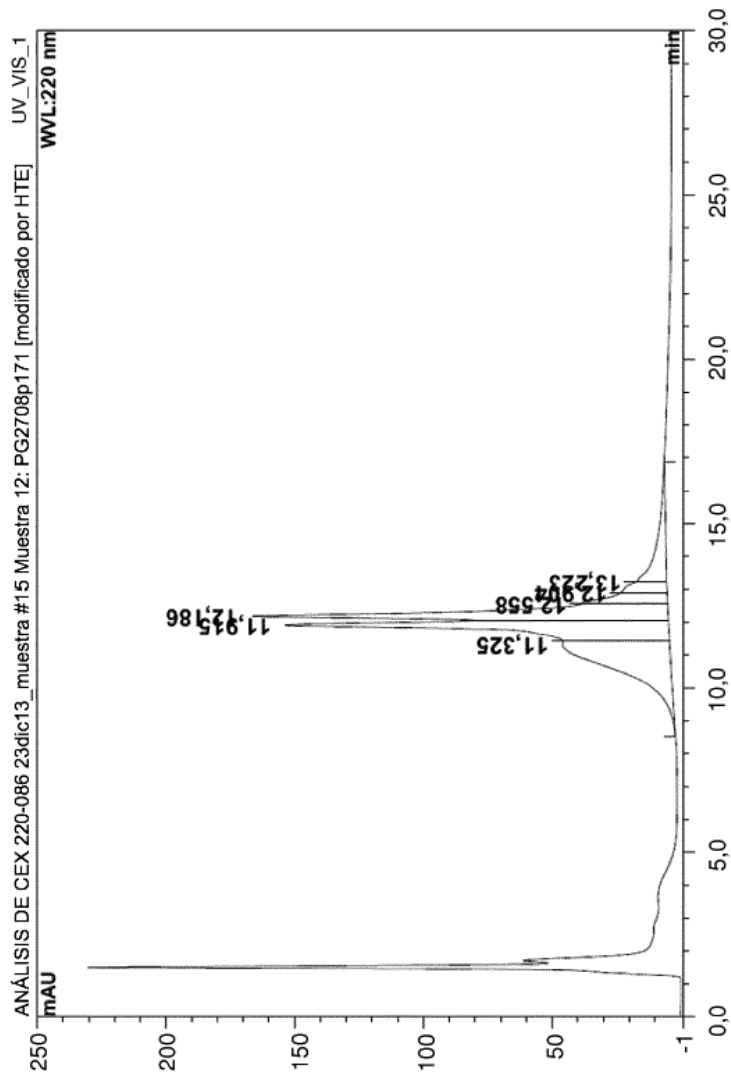


Fig. 7, Continuación

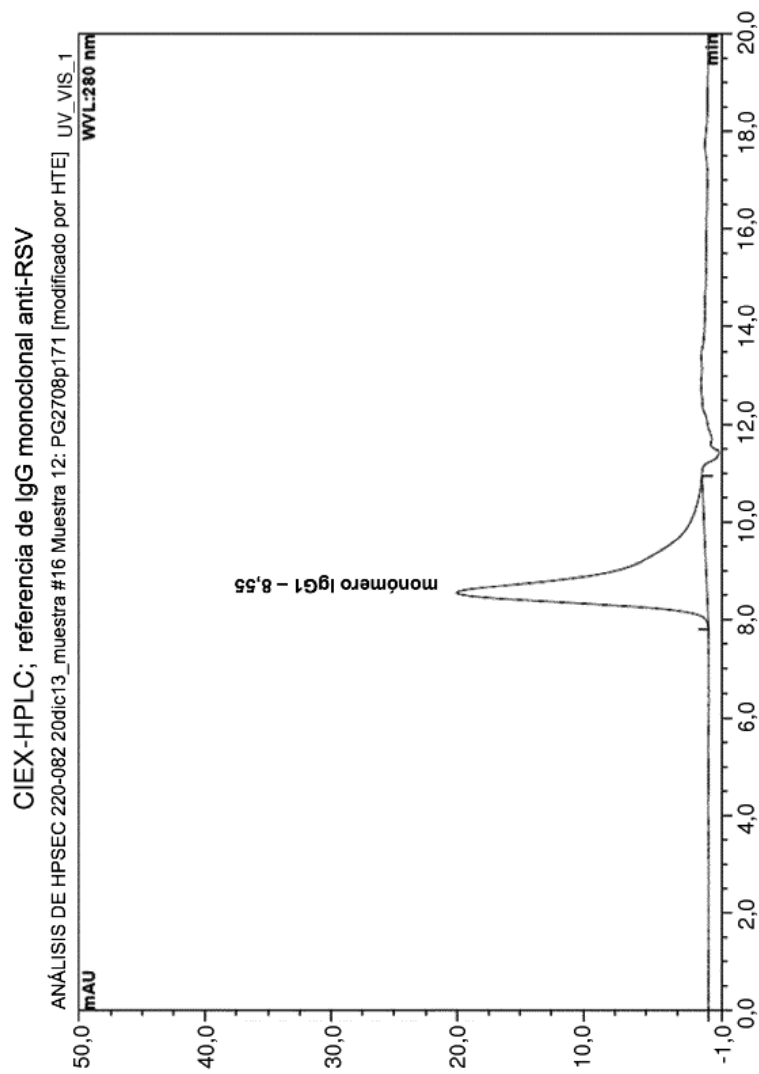


Fig. 7, Continuación

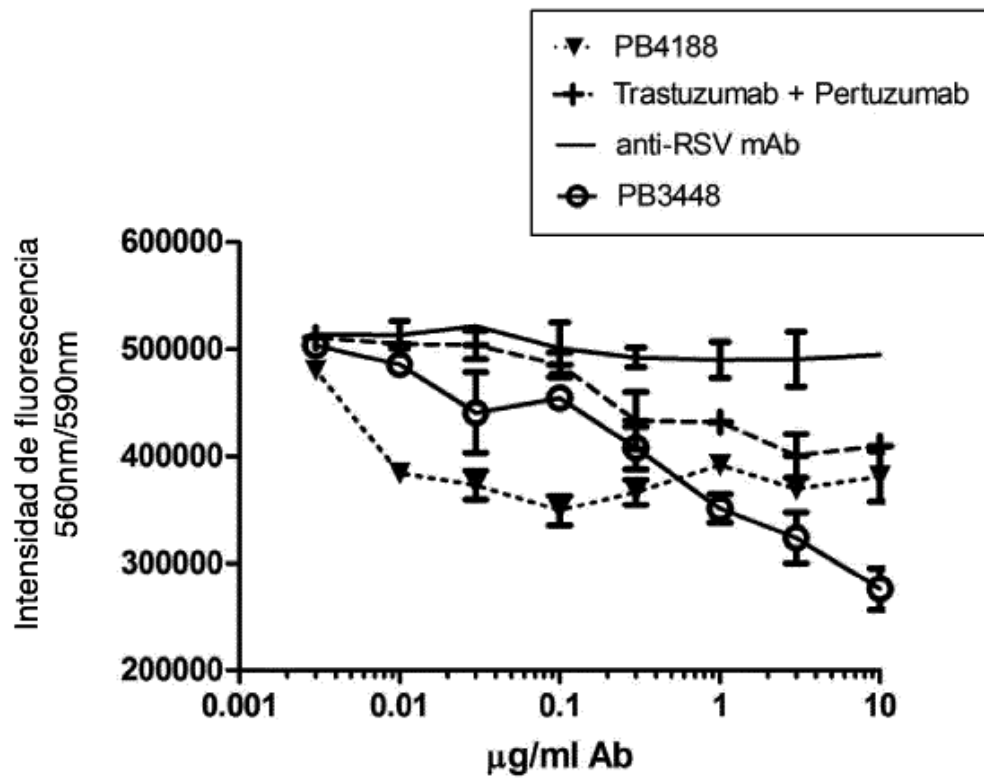


Fig. 8

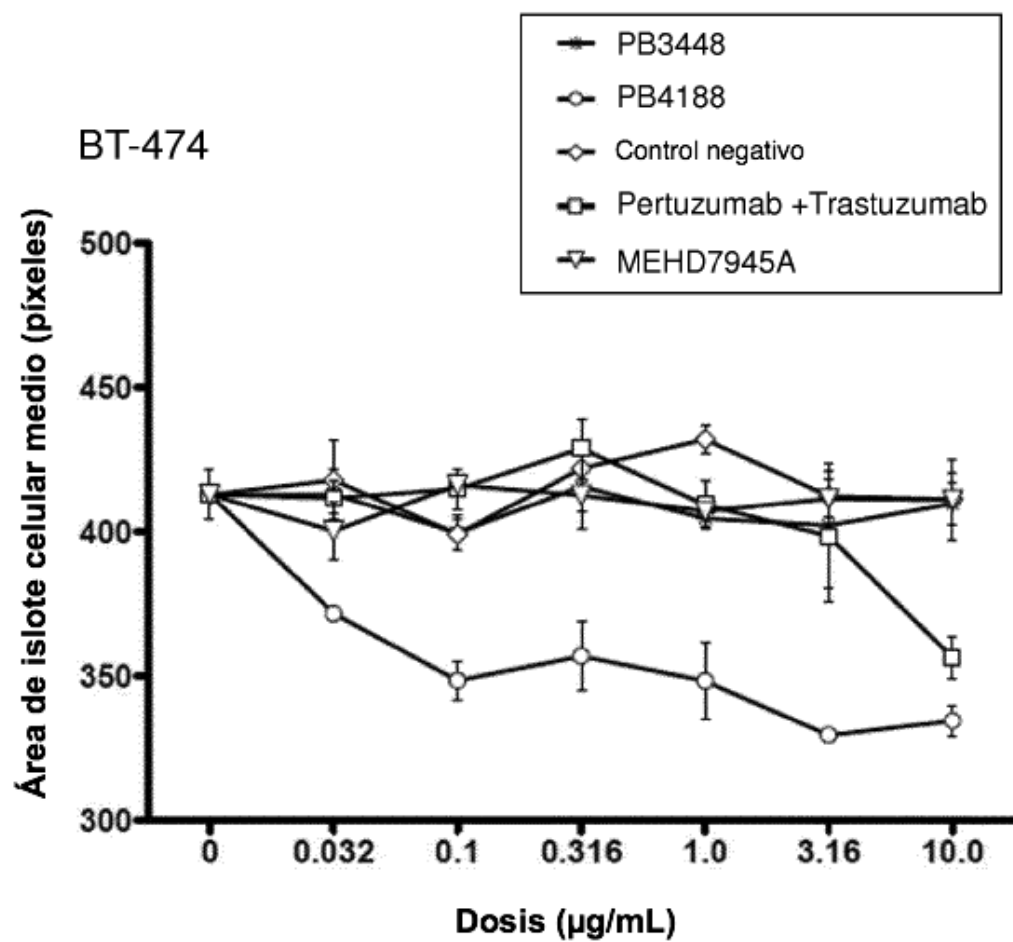


Fig. 9

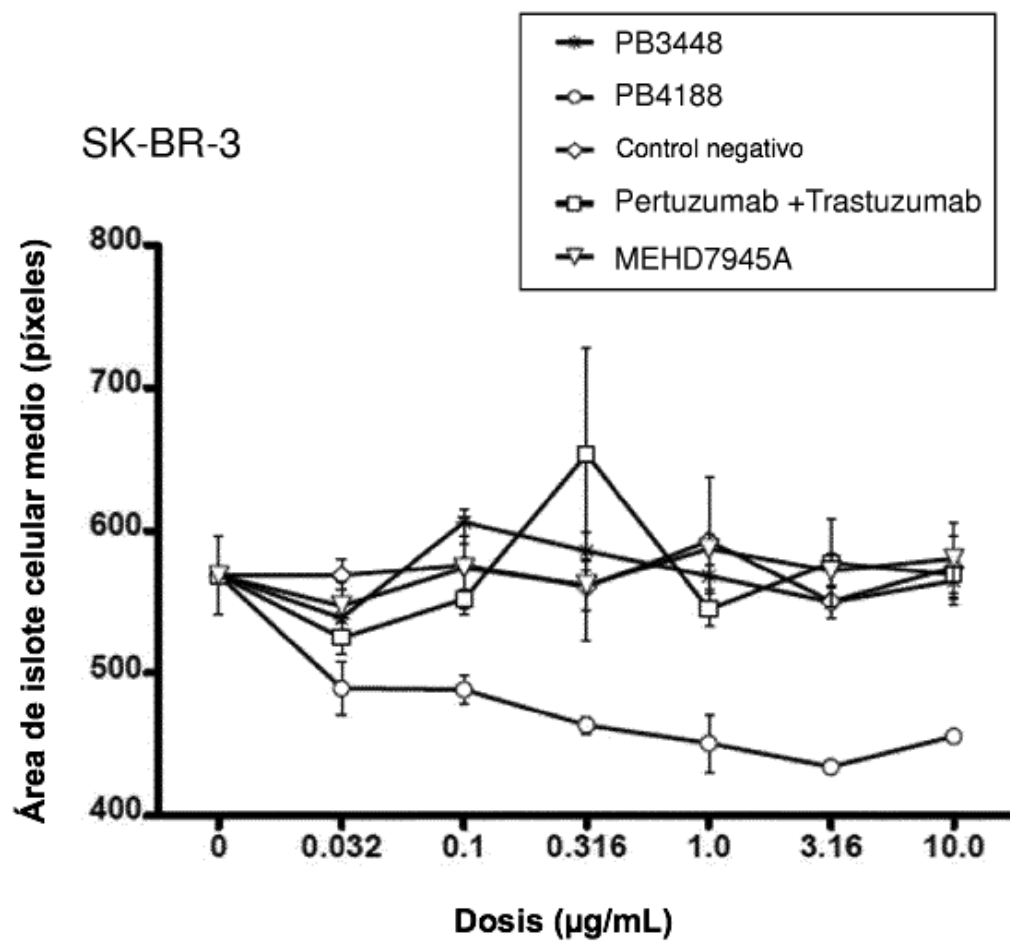


Fig. 9. Continuación

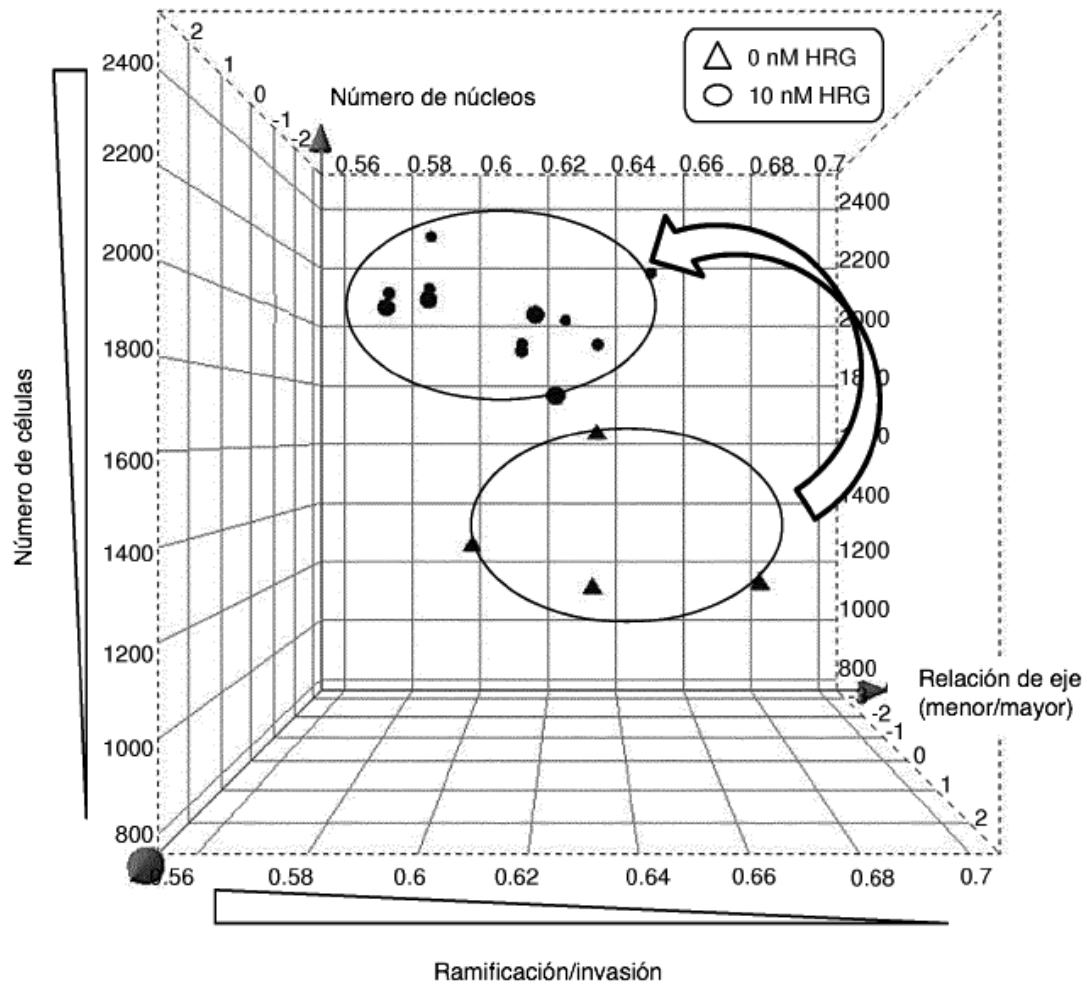


Fig. 10A

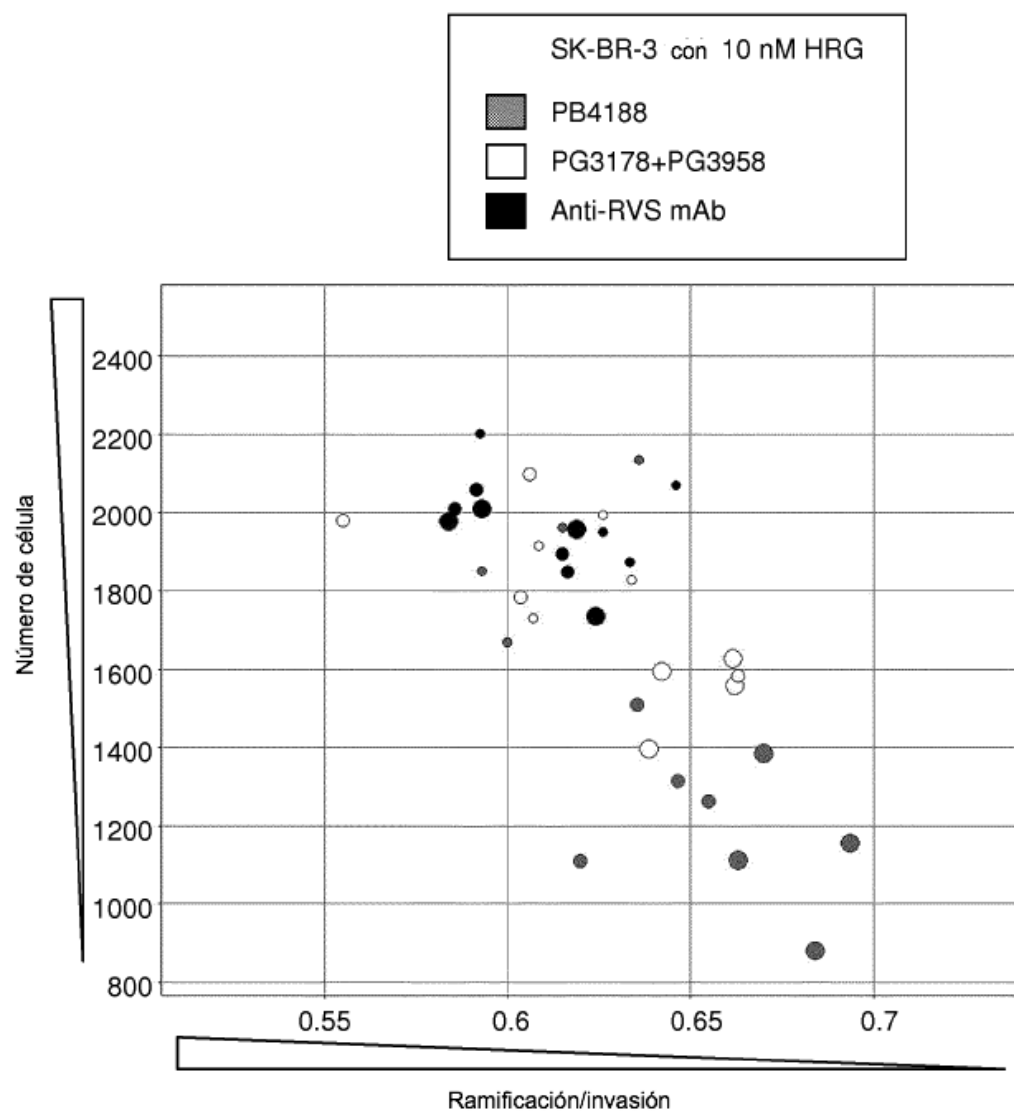


Fig. 10B

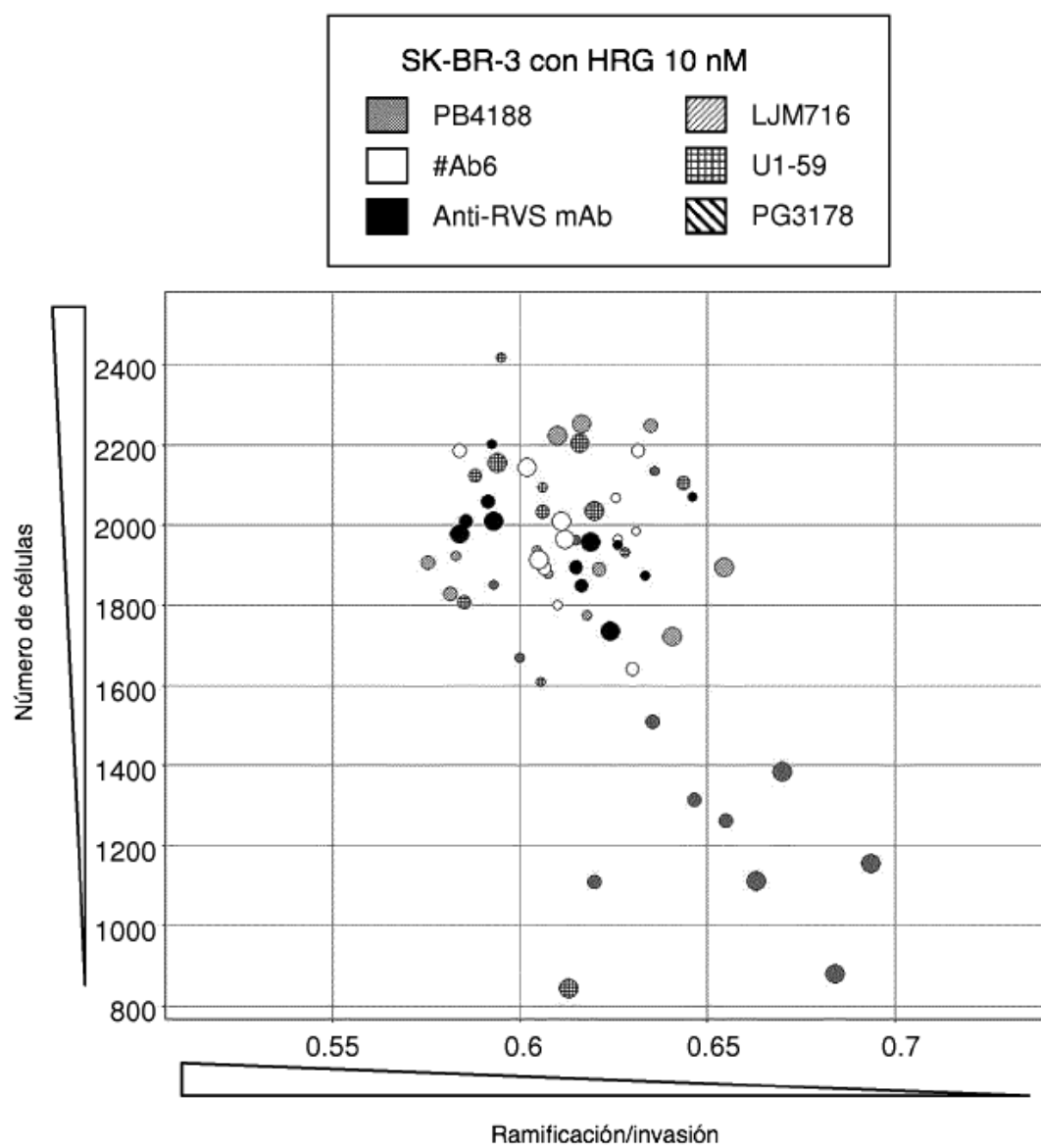


Fig. 10C

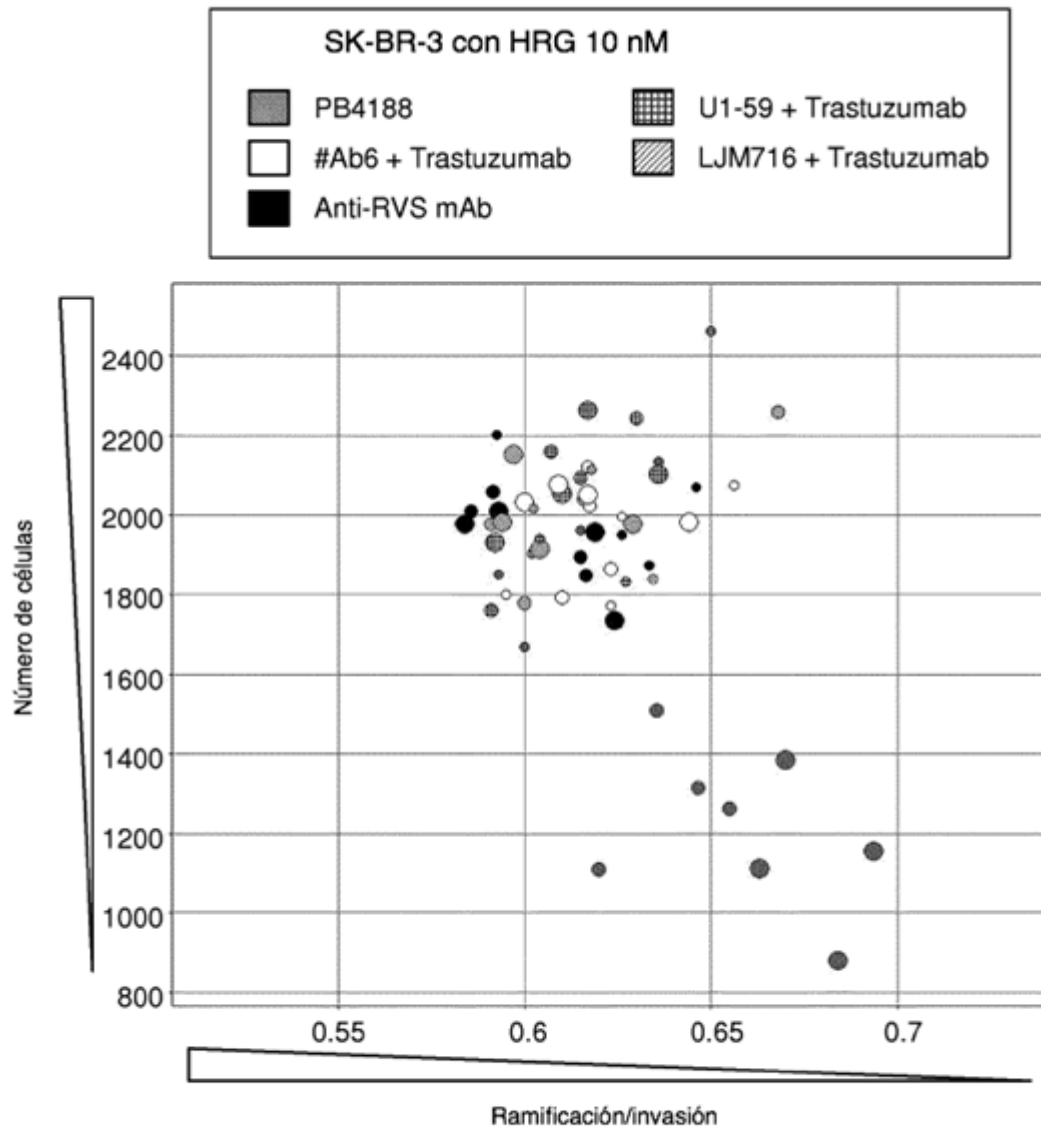
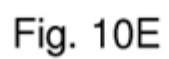


Fig. 10D



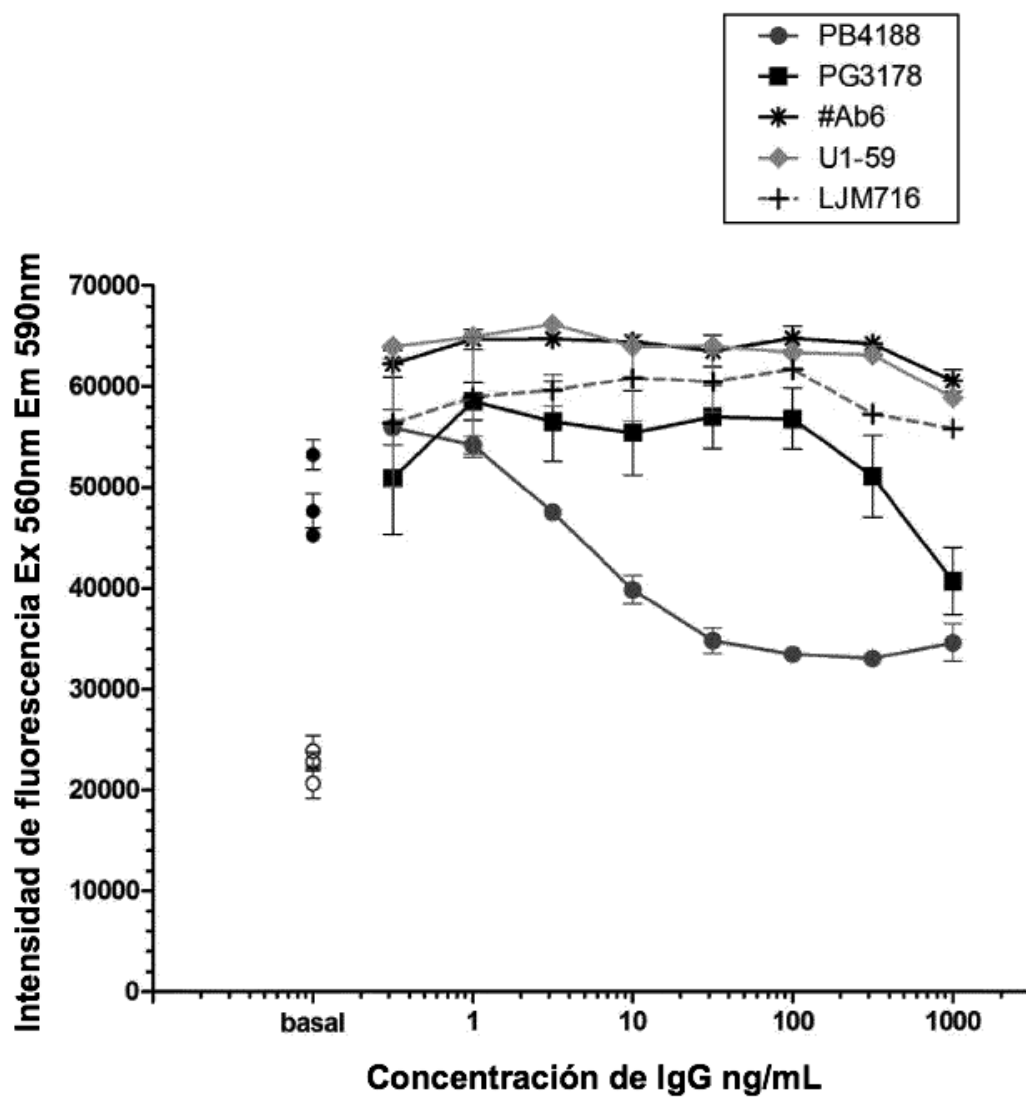


Fig. 11

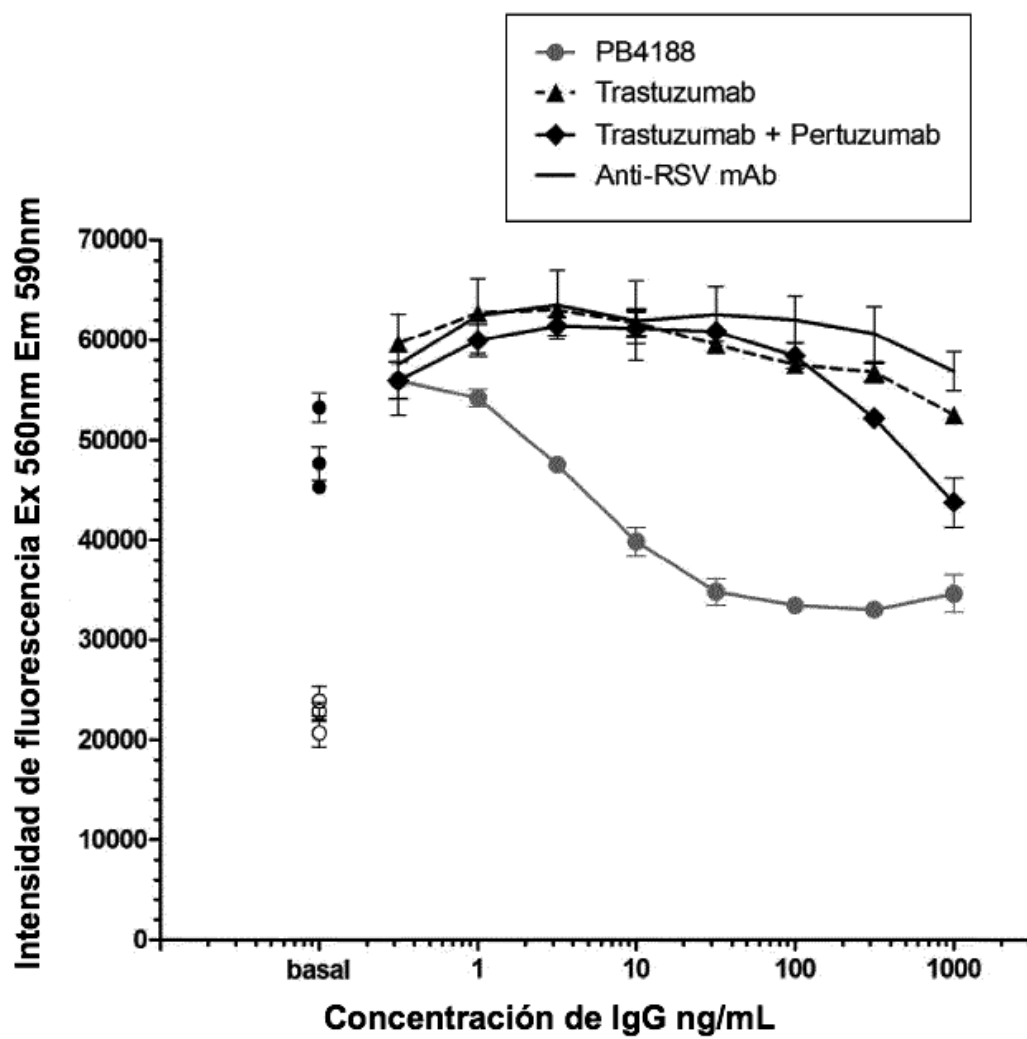


Fig. 11, Continuación

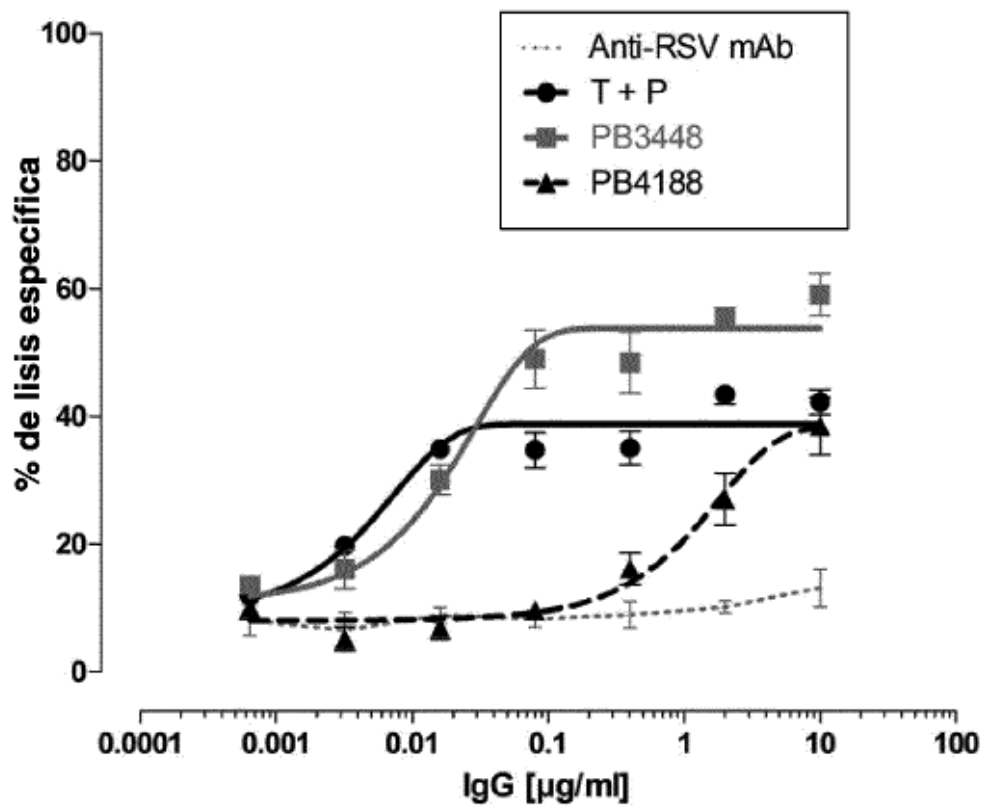
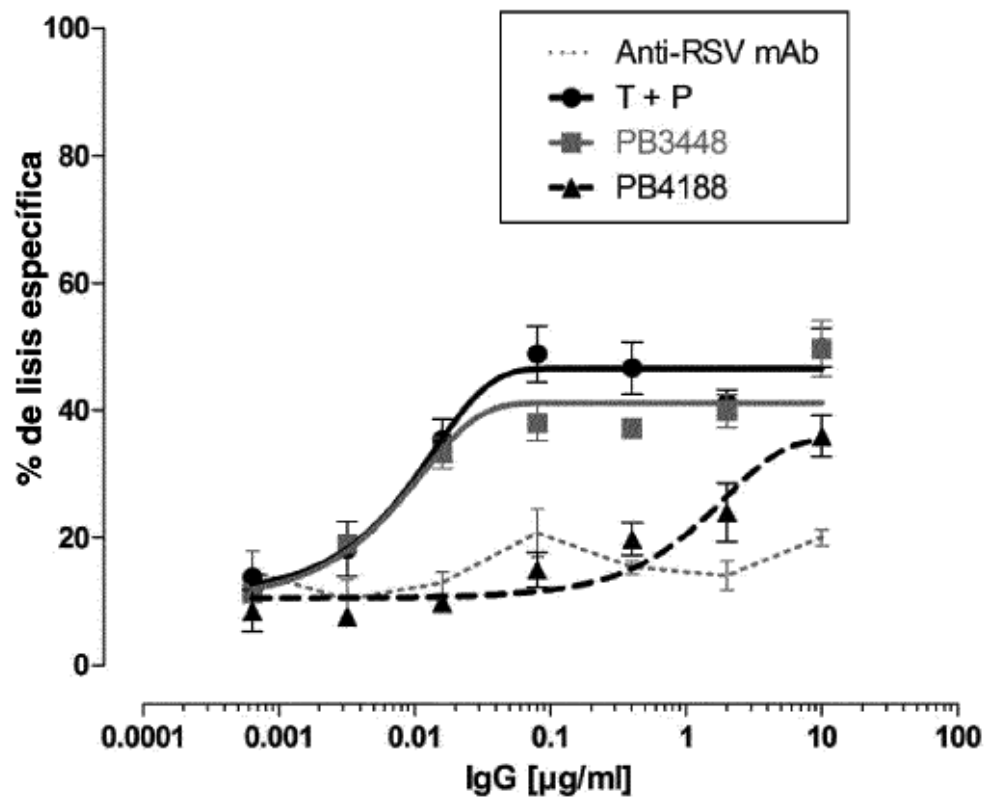


Fig. 12

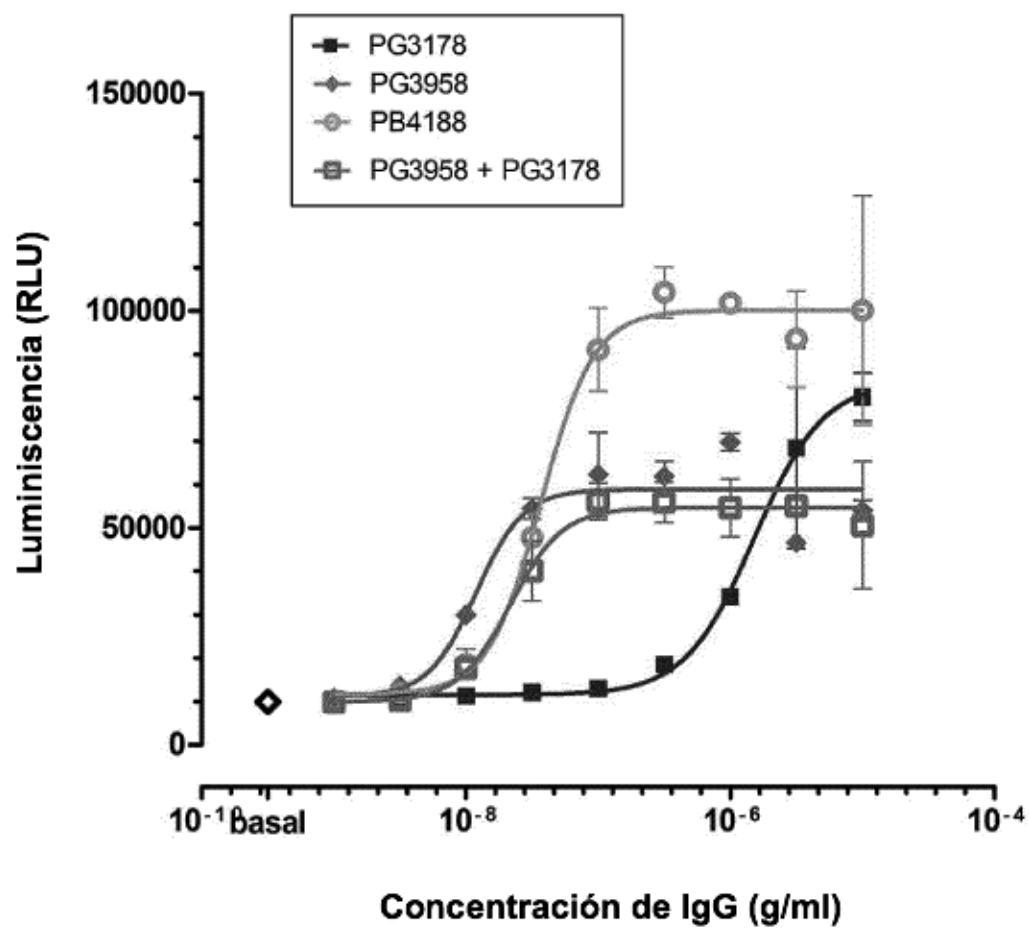


Fig. 13

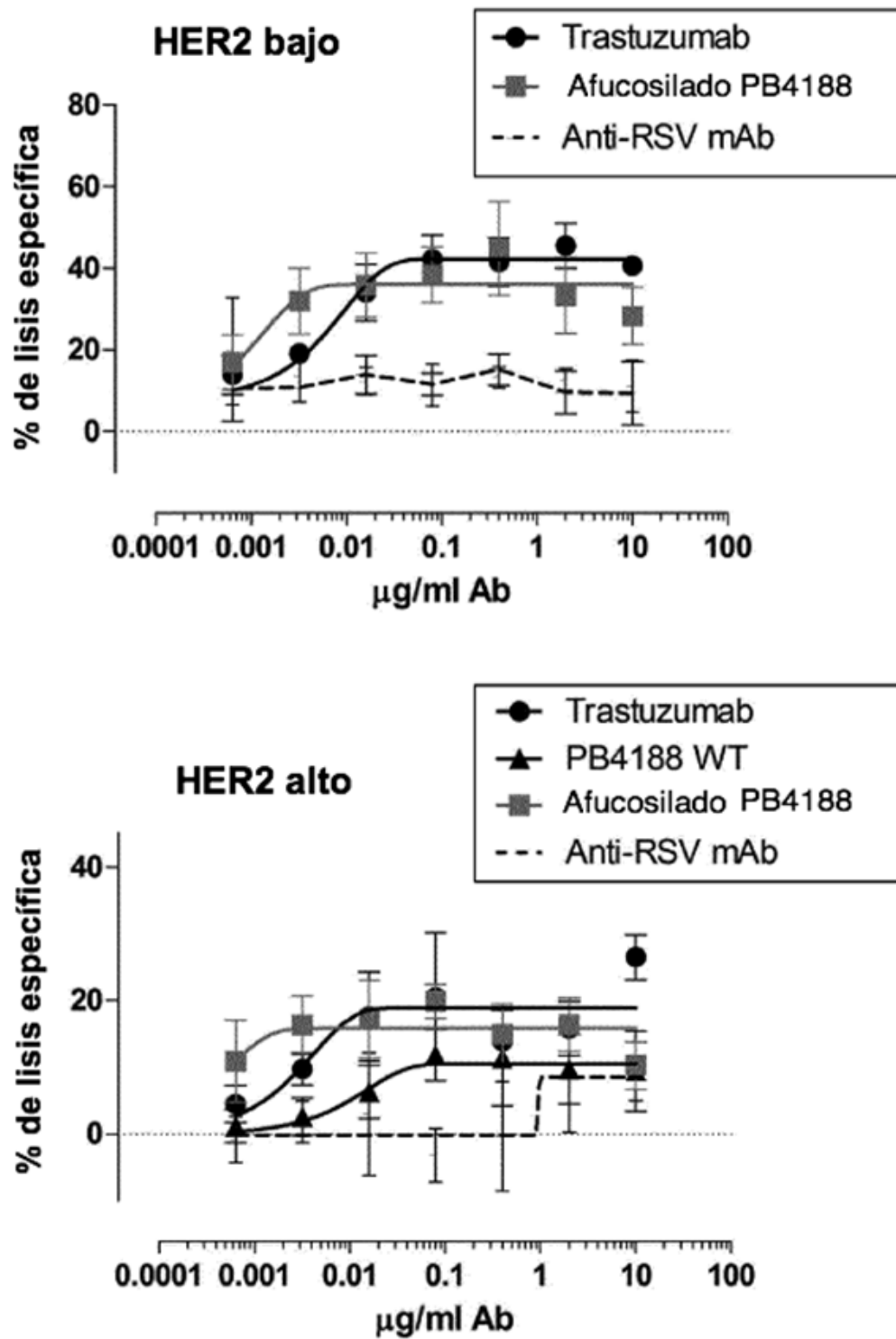


Fig. 14

Variante de Fc γ R alto (V158)

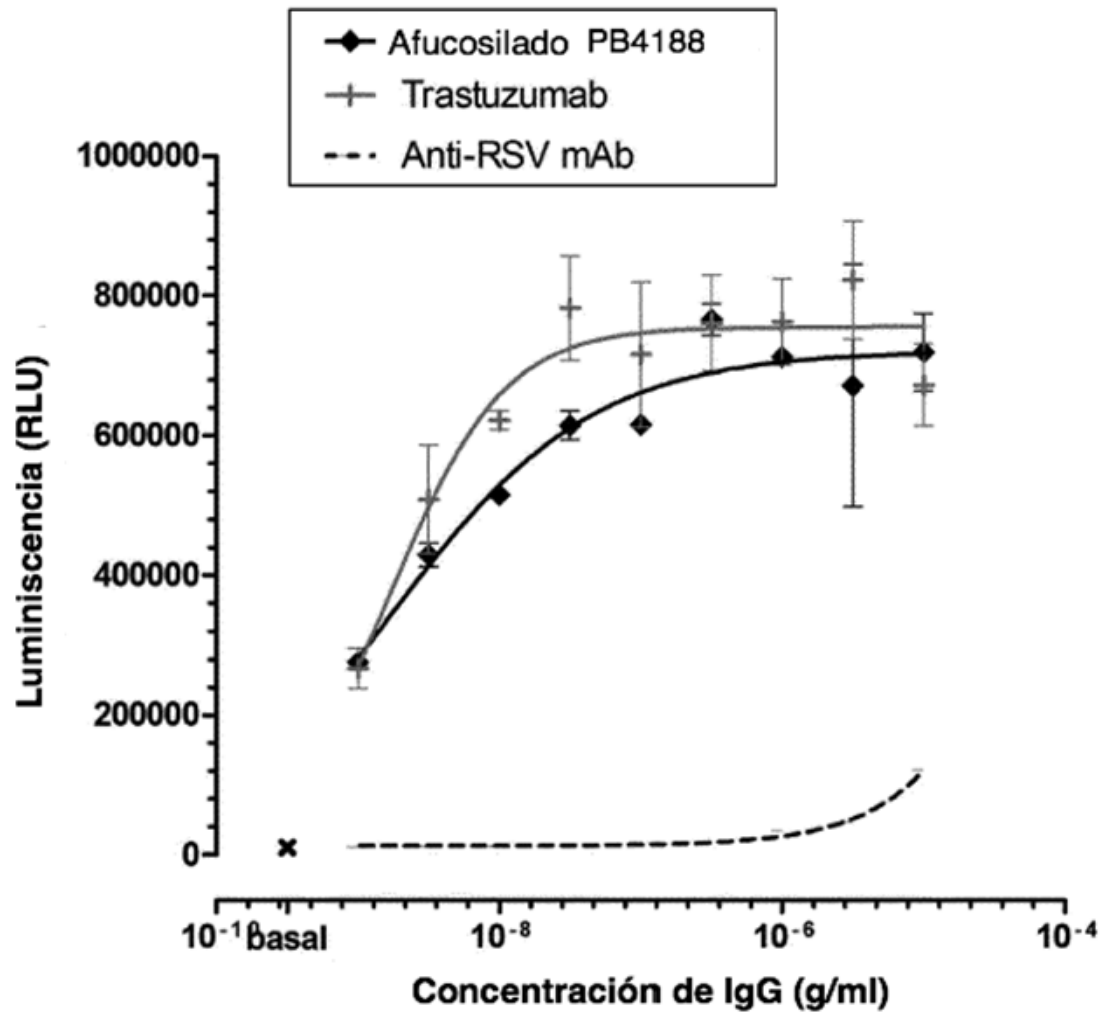


Fig. 15

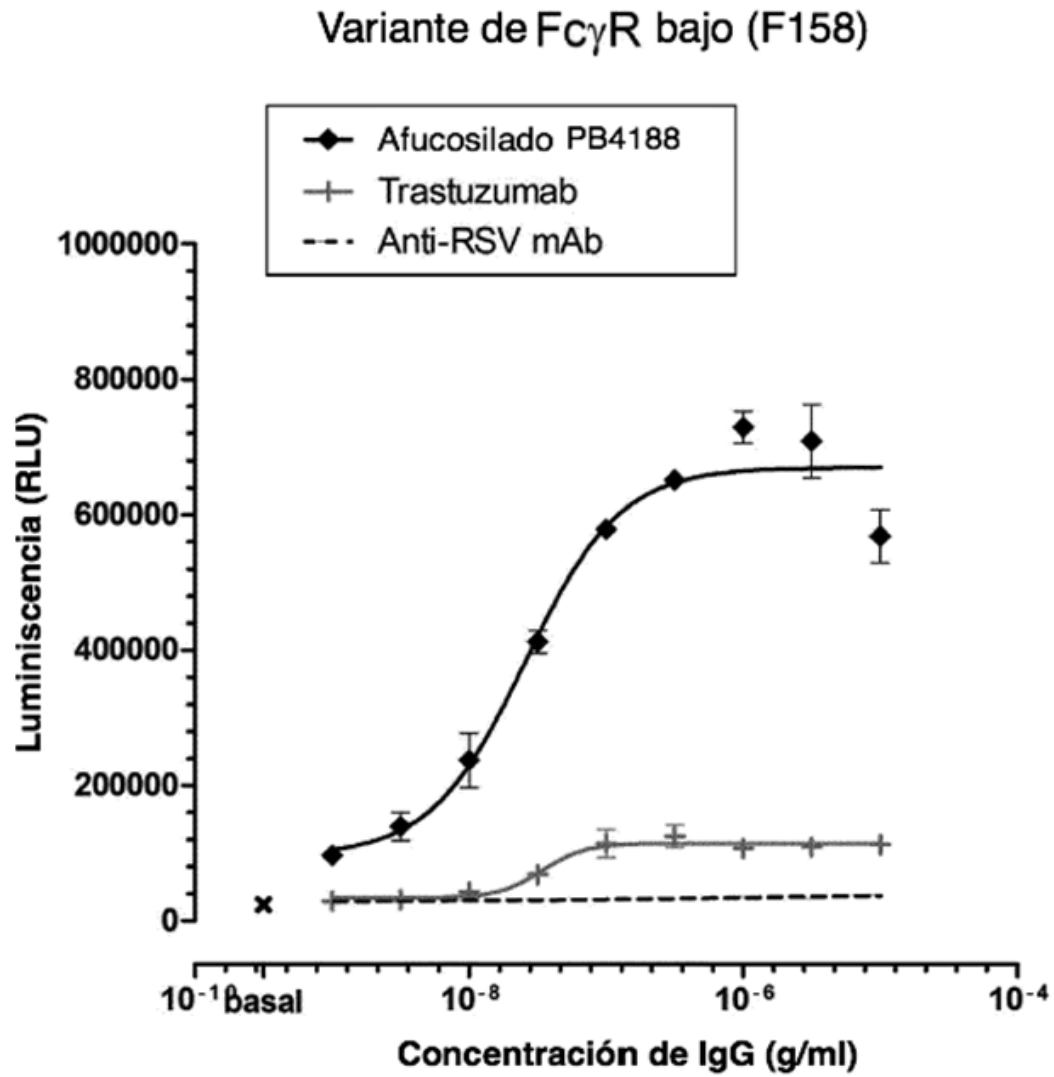


Fig. 15, Continuación

Fig. 16A

MF2926: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2
 Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1   GGCCCAGCCG GCCAIGGCCC AGGTCAGCT GCAGCAGTCT GGACCTGAGC TGGTGAAACC
61  TGGGGCTTCA GTGATGATTT CCTGCAAGGC TTCTGGTTAC TCATTCACTG GCTACCAAT
121 GAACTGGGTG AAGCAAAGTC CTGAAAAGAG CCTTGAGTGG ATTGGAGACA TAAATCCTAG
181 CATTGGTACG ACTGCCCACA ACCAGATTTT CAGGGCCAAG GCCACAATGA CTGTTGACAA
241 ATCCTCCAAC ACAGCCTACA TGCAGCTCAA GAGCCTGACA TCTGAAGACT CTGGAGTCTT
301 TTA CTGTGTT AGAAGAGGGG ACTGGTCCTT CGATGTCTGG GGCACAGGGA CCACGGTCAC
361 CGTCTCCAGT
    
```

Secuencia de aminoácido:

QVQLQQSGPELVKPGASVMISCKASGYSFTGYHNMWVKQSPEKSLEWIGDINPSIGT
 TAHNQIFRAKATMTVDKSSNTAYMQLKSLTSEDSGVFYCVRRGDWSFDVWGTGTTV
 TVSS

CDR1: GYHNMWVKQSPEKSLE

CDR2: NQIFRA

CDR3: RGDWSFDV

Fig. 16 A, Continuación

MF2930: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGGGCTGAAC TGGTGAAGCC
61 TGGAGCCTCA GTGATGATGT CCTGTAAGGT TTCTGGCTAC ACCTTCACCT CCTATCCTAT
121 AGCGTGGATG AAGCAGGTTT ATGAAAAGAG CCTAGAGTGG ATTGGAAATT TTATCCTTA
181 CAGTGATGAT ACTAAGTACA ATGAAAACCT CAAGGGCAAG GCCACATTGA CTGTAGAAAA
241 ATCCTCTAGC ACAGTCTACT TGGAGCTCAG CCGATTAACT TCTGATGACT CTGCTGTTTA
301 TTAAGTGTCG AGAAGTAACC CATTATATTA CTTTGCTATG GACTACTGGG GTCAAGGAAC
361 CTCGGTCACC GTCTCCAGT

```

Secuencia de aminoácido:

EVQLQQSGAELVKPGASVMMSCCKVSGYFTTSYPIAWMKQVHGKSLEWIGNFHPYSD
DTKYNENFKGKATLTVEKSSSTVYLELSRLTSDDSAVYYCARSNPLYFFAMDYWGQG
TSVTVSS

CDR1: SYPIAWMKQVHGKSLE

CDR2: NENFKG

CDR3: SNPLYFFAMDY

Fig. 16 A, Continuación

MF1849: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2
 Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGGAGGCG TGGTCCAGCC
61 TGGGAGGTCC CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTG ACCTTCAGTA GCTATGGCAT
121 GCACTGGGTC CGCCAGGCCT CAGGCAAGGG GCTGGAGTGG GTGGCAGTTA TATCATATGA
181 TGGAAGTAAT AAATACTATG CAGACTCCGT GAAGGGCCGA TTCACCATCT CCAGAGACAA
241 TTCCAAGAAC ACGCTGTATC TGCAAATGAA CAGCCTGAGA GCTGAGGACA CGGCCGTGTA
301 TTACTGTGCA AAAGGTGACT ACGGTTCTTA CTCTTCTTAC GCCTTTGATT ATTGGGGCCA
361 AGGTACCCTG GTCACCGTCT CCAGT
    
```

Secuencia de aminoácido:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
 NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDYGSYSSYAFDYWG
 QGTLTVTVSS

CDR1: SYGMH

CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG

CDR3: GDYGSYSSYAFDY

Fig. 16 A, Continuación

MF2973: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2
 Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61 TGGGGCTTCA GTGAAGTTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ATTTTCACTG GCTACTATAT
121 AAACCTGGTTG AGGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAATGG ATTGCAAAAA TTIATCCTGG
181 AAGTGGTAAT ACTTACTACA ATGAGAAGTT CAGGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGAAGA
241 ATCCTCCAGC ACTGCCTACA TGCAGCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGAGGGCCCC ACTATGATTA CGACGGCCCC TGGTTTGTTT ACTGGGGCCA
361 AGGGACTCTG GTCACCGTCT CCAGT
    
```

Secuencia de aminoácido:

QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYIFTGYYINWLRQRPQG¹GLEWIAKIYPGSGNT
 YYNEKFRGKATLTAEESSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGPHYDYDGPWFVYWGQ
 GTLVTVSS

CDR1: GYYINWLRQRPQG¹GLE

CDR2: NEKFRG

CDR3: GPHYDYDGPWFVY

Fig. 16 A, Continuación

MF3004: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2
 Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61 TGGGGCITCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCACIG GCTACTATAT
121 AAACCTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAGTGG ATTGCAAGGA TTTATCCTGG
181 AAGTGGTTAT ACTTACTACA ATGAGAAGTT CAAGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGAAGA
241 ATCCTCCAGC ACTGCCTACA TGCACCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGACCCCACT ATGGTTACGA CGACTGGTAC TTCGGTGTCT GGGGCACAGG
361 CACCACGGTC ACCGTCTCCA GT
    
```

Secuencia de aminoácido:

QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTGYYINWVKQRPGQGLEWIARIYPGSGY
 TYYNEKFKGKATLTAEESSTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARPHYGYDDWYFGVWGT
 GTTIVTVSS

CDR1: GYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NEKFKG

CDR3: PHYGYDDWYFGV

Fig. 16 A, Continuación

MF2971: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2
 Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61 TGGGGCTTCA GTGAAACTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCAC TG CCTACTATAT
121 AAACTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAGTGG ATTGCAAGGA TTTATCCTGG
181 AAGTGGCTAT ACTTACTACA ATGAGATTTT CAAGGGCAGG GCCACACTGA CTGCAGACGA
241 ATCCTCCAGC ACTGCCTACA TGCAACTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGACCTCCGG TCTACTATGA CTCGGCCTGG TTTGCTTACT GGGGCCAAGG
361 GACTCTGGTC ACCGTCTCCA GT
    
```

Secuencia de aminoácido:

QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVKQRPGQGLEWLIARIYPGSGY
 TYYNEIFKGRATLTADESSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARPPVYYDSAWFAYWGQG
 TLVTVSS

CDR1: AYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NEIFKG

CDR3: PPVYYDSAWFAY

Fig. 16 A, Continuación

MF3025: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2
 Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61 TGGGACTTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCAC TG GCTACTATAT
121 AAACTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAGTGG ATTGCAAGGA TTTATCCTGG
181 AAGTGTTTAT ACTTACTACA ATGAGAAGTT CAAGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGAAGA
241 ATCCTCCAAC ACTGCCTATA TGCACCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGGCCCCACT ATGGTTACGA CGACTGGTAC TTCGCTGTCT GGGGCACAGG
361 GACCACGGTC ACCGTCTCCA GT
    
```

Secuencia de aminoácido:

QVQLKQSGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTGYYINWVKQRPGQGLEWIARIYPGSGY
 TYYNEKFKGKATLTAEESNTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARPHYGYDDWYFAVWGT
 GTTVTVSS

CDR1: GYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NEKFKG

CDR3: PHYGYDDWYFAV

Fig. 16 A, Continuación

MF2916: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2
 Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61 TGGGGCTTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCAGTG GCTACTATAT
121 AAACCTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAGTGG ATTGCAAGGA TTTATCCTGG
181 CAGTGGTTCAT ACTTCCTACA ATGAGAAGTT CAAGGGCAAG GCCACACTGA CTACAGAAAA
241 ATCCTCCAGC ACTGCCTACA TGCAGCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGACCTATCT ACTTTGATTA CGCAGGGGGG TACTTCGATG TCTGGGGCAC
361 AAGAACCTCG GTCACCGTCT CCAGT

```

Secuencia de aminoácido:

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTGYYINWVKQRPGQGLEWIARIYPGSGH
 TSYNEKFKGKATLTTEKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARPIYFDYAGGYFDVWGTR
 TSVTVSS

CDR1: GYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NEKFKG

CDR3: PIYFDYAGGYFDV

Fig. 16 A, Continuación

MF3958: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2
 Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGCGCCGAAG TGAAGAAACC
61  TGGCGCCAGC GTGAAGCTGA GCTGCAAGGC CAGCGGCTAC ACCTTCACCG CCTACTACAT
121 CAACTGGGTC CGACAGGCCC CAGGCCAGGG CCTGGAATGG ATCGGCAGAA TCTACCCCGG
181 CTCCGGCTAC ACCAGCTACG CCCAGAAGTT CCAGGGCAGA GCCACCCTGA CCGCCGACGA
241 GAGCACCAGC ACCGCCTACA TGGAAGTGA CAGCCTGCGG AGCGAGGATA CCGCCGTGTA
301 CTTCGCGCC AGACCCCCCG TGTACTACGA CAGCGCTTGG TTTGCCTACT GGGGCCAGGG
361 CACCCTGGTC ACCGTCTCCA GT
    
```

Secuencia de aminoácido:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVRQAPGQGLEWIGRIYPGSGY
 TSYAQKFQGRATLTADESTSTAYMELSSLRSED TAVYFCARPPVYYDSAWFAYWGQG
 TLVTVSS

CDR1: AYYIN
 CDR2: RIYPGSGYTSYAKFQG
 CDR3: PPVYYDSAWFAY

Fig. 16 A, Continuación

MF3031: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61  TGGGGCTTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACTTTCAC TG CCTACTATAT
121 AACTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGACAGGG ACTTGAGTGG ATTGCAAAGA TTTATCCTGG
181 AAGTGGTTAT ACTTACTACA ATGAGAATTT CAGGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGAAGA
241 ATCCTCCAGT ACTGCCTACA TACAACCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCTGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGAGGCGTCT ATGATTACGA CGGGGCCTGG TTTGCTTACT GGGGCCAAGG
361 GACTCTGGTC ACCGICTCCA GT
    
```

Secuencia de aminoácido:

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVKQRPGQGLEWIAKIYPGSGY
 TYYNENFRGKATLTAEESSTAYIQLSSLTSEDSAVYFCARGVYDYDGAWFAYWGQG
 TLVTVSS

CDR1: AYYINWVKQRPGQGLE

CDR2: NENFRG

CDR3: GVYDYDGAWFAY

Fig. 16 A, Continuación

MF3991: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGCGCCGAAG TGAAGAAACC
61  TGGCGCCAGC GTGAAGCTGA GCTGCAAGGC CAGCGGCTAC ACCTTCACCG CCTACTACAT
121 CAACTGGGTC CGACAGGCCC CAGGCCAGGG CCTGGAATGG ATCGGCAGAA TCTACCCCGG
181 CTCCGGCTAC ACCAGCTACG CCCAGAAGTT CCAGGGCAGA GCCACCCTGA CCGCCGACGA
241 GAGCACCAGC ACCGCCTACA TGGAAGTGA CAGCCTGCGG AGCGAGGATA CCGCCGTGTA
301 CTTCTGCGCC AGACCCCACT ACGGCTACGA CGACTGGTAC TTCGGCGTGT GGGGCCAGGG
361 CACCCTGGTC ACCGTCTCCA GT

```

Secuencia de aminoácido:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVRQAPGQGLEWIGRIYPSGY
 TSYAQKFQGRATLTADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARPHYGYDDWYFGVWGQ
 GTLVTVSS

CDR1: AYYIN

CDR2: RIYPSGYTSY AQKFQG

CDR3: PHYGYDDWYFGV

Fig. 16B

MF3178: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-3

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61 TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTAA
181 CAGTGGTGGC ACAAATATG CACAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241 GTCCATCAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCTGTGTA
301 TTACTGTGCA AGAGATCATG GTTCTCGTCA TTCTGGTCT TACTGGGGCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T
    
```

Secuencia de aminoácido :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNS
GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDHGSRHFWSYWGFDYWGQGTLVTVSS

CDR1: GYYMH

CDR2: WINPNSGGTNYAQKFQG

CDR3: DHGSRHFWSYWGFDY

Fig. 16B, Continuación

MF3176: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-3

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTGCAGCT GTTGGAGTCT GGGGGAGGCT TGGTACAGCC
61 TGGGGGGTCC CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTG ACCTTTAGCA GCTATGCCAT
121 GAGCTGGGTC CGCCAGGCTC CAGGGAAGGG GCTGGAGTGG GTCTCAGCTA TTAGTGGTAG
181 TGGTGGTAGC ACATACTACG CAGACTCCGT GAAGGGCCGG TTCACCATCT CCAGAGACAA
241 TTCCAAGAAC ACGCTGTATC TGCAAATGAA CAGCCTGAGA GCCGAGGACA CGGCTGTGTA
301 TTACTGTGCA AGAGATTGGT GGTACCCGCC GTACTACTGG GGCTTTGATT ATTGGGGCCA
361 AGGTACCCCTG GTCACCGTCT CCAGT

```

Secuencia de aminoácido:

EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRL~~SCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
 TYYADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMNS~~LR~~AEDT~~AVYYCARDWWYPPYYWGFDYWG
 QGTLVTVSS

CDR1: SYAMS
 CDR2: AISGSGGSTYYADSVKG
 CDR3: DWWYPPYYWGFDY

Fig. 16B, Continuación

MF3163: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-3

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61 TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTAA
181 CAGTGGTGGC ACAAATATG CACAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241 GTCCATCAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCCGTGTA
301 TTACTGTGCA AAAGATTCTT ACTCTCGTCA TTTCTACTCT TGGTGGGCCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

```

Secuencia de aminoácido:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNS
GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAKDSYSRHFYSWWAF
DYWGQGTLVTVSS

CDR1: GYYMH

CDR2: WINPNSGGTNYAQKFQG

CDR3: DYSRHFYSWWAFDY

Fig. 16B, Continuación

MF3099: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-3

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTCCAGCT GCAGCAGCCT GGGGCTGAGC TGGTGAGGCC
61 TGGGACTTCA GTGAAGTTGT CCTGCAAGGC TTCTGGCTAC ACCTTCACCA GCTACTGGAT
121 GCACTGGGTA AAGCAGAGGC CTGGACAAGG CCTTGAGTGG ATCGGAATTC TTGATCCTTC
181 TGATAGTTAT ACTACCTACA ATCAAAAGTT CAAGGGCAAG GCCACATTAA CAGTAGACAC
241 ATCCTCCAGC ATAGCCTACA TGCAGCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCGCTCTA
301 TTACTGTGCA AGAGGGGGAG ATTACGACGA GGGAGGTGCT ATGGACTACT GGGGTCAAGG
361 AACCTCGGTC ACCGTCTCCA GT

```

Secuencia de aminoácido:

EVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGILDPSDSY
 TTYNQKFKGKATLTVDTSSSIAYMQLSSLTSEDSALYYCARGGDYDEGGAMDYWGQ
 GTSVTVSS

CDR1: SYWMH

CDR2: ILDPDSYTTYNQKFKG

CDR3: GGDYDEGGAMDY

Fig. 16B, Continuación

MF3307: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-3

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61 TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTAA
181 CAGTGGTGGC ACAAACATG CACAGAAGT T CAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241 GTCCATCAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCCGTGTA
301 TTACTGTGCA AGAGGTTCTC GTAAACGTCT GTCTAACTAC TTCAACGCCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

```

Secuencia de aminoácido:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNS
GGTNYAQKFQGGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGSRKRLSNYFNAFD
YWGQGTLVTVSS

CDR1: GYYMH

CDR2: WINPNSGGTNYAQKFQG

CDR3: GSRKRLSNYFNAFDY

Fig. 16C

a) Cadena ligera común

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig. 16D

Cadena pesada para unión de erbB-2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVRQAPGQGLEWIGRIYPGSGY
TSYAQKFQGRATLTADDESTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARPPVYYDSAWFAYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTDPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Cadena pesada para unión de erbB-3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNS
GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDVAVYYCARDHGSRRHFSYWG
DYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Fig. 16E

Secuencias de Ab específico para HER2

MF2889: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1   GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTCCAGCT GCAGCAGTCT GGAGCTGAGC TGGTAAGGCC
61  TGGGACTTCA GTGAAGGIGT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC GCCTTCACTA ATTATTTGAT
121 AGAGTGGGTA AAGCAGAGGC CTGGCCAGGG CCTTGAGTGG ATTGGAGTGA TTTATCCTGA
181 AGGTGGTGGT ACTATCTACA ATGAGAAGTT CAAGGGCAAG GCAACACTGA CTGCAGACAA
241 ATCCTCCAGC ACTGCCTACA TGCAGCTCAG CGGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCGGTCTA
301 TTTCTGTGCA AGAGGAGACT ATGATTACAA ATATGCTATG GACTACTGGG GTCAAGGAAC
361 CTCGGTCACC GTCTCCAGT
    
```

Secuencia de aminoácido:

EVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPQGQLEWIGVIYPEGGG
 TIYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARGDYDYKYAMDYWGQG
 TSVTVSS

CDR1: NYLIE

CDR2: VIYPEGGGTIYNEKFKG

CDR3: GDYDYKYAMDY

Fig. 16E, Continuación

MF2913: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTCAAGCT GCAGCAGTCT GGACCTGAGC TGGTGAAGCC
61 TGGCGCTTCA GTGAAGATAT CCTGCAAGGC TTCTGGTTAC TCATTCACTG ACTACAAAAT
121 GGACTGGGTG AAGCAGAGCC ATGGAAAGAG CCTCGAATGG ATTGGAAATA TTAATCCTAA
181 CAGTGGTGGT GTTATCTACA ACCAGAAGTT CAGGGGCAAG GTCACATTGA CTGTTGACAG
241 GTCCTCCAGC GCAGCCTACA TGGAGCTCCG CAGCCTGACA TCTGAGGACA CTGCAGTCTA
301 TTATTGTTCA AGAGGACTGT GGGATGCTAT GGACTCCTGG GGTCAAGGAA CCTCGGTCAC
361 CGTCTCCAGT

```

Secuencia de aminoácido:

EVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYKMDWVKQSHGKSLEWIGNINPNSGG
 VIYNQKFRGKVTLTVDRSSSAAYMELRSLTSEDVAVYYCSRGLWDAMDSWGQGTSVT
 VSS

CDR1: DYKMDWVKQSHGKSLE

CDR2: NQKFRG

CDR3: GLWDAMDS

Fig. 16E, Continuación

MF1847: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTTGAGTCT GGGGGAGGCG TGGTCCAGCC
61  TGGGAGGTCC CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTG ACCTTCAGTA GCTATGGCAT
121 GCACTGGGTC CGCCAGGCTC CAGGCAAGGG GCTGGAGTGG GTGGCAGTTA TATCATATGA
181 TGGAAGTAAT AAATACTATG CAGACTCCGT GAAGGGCCGA TTCACCATCT CCAGAGACAA
241 TTCCAAGAAC ACGCTGTATC TGCAAATGAA CAGCCTGAGA GCTGAGGACA CGGCCGTGTA
301 TTACTGTGCA AAAGGTTGGT GGCATCCGCT GCTGTCTGGC TTTGATTATT GGGGCCAAGG
361 TACCCTGGTC ACCGTCTCCA GT
  
```

Secuencia de aminoácido:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
 NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWWHPLLSGFDYWG
 QGTLVTVSS

CDR1: SYGMH

CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG

CDR3: GWWHPLLSGFDY

Fig. 16E, Continuación

MF3001: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCG AGGTCAGCT GCAGCAGTCT GGGGCTGAAC TGGCAAAACC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGCTGT CCTGCAAGAC TTCTGGCTAC AACTTTCCTA TCTACTGGAT
121 GCACTGGGTA AAACAGAGGC CTGGACGGGG TCTGGAATGG ATTGGATACA TTAATCCTAG
181 TACTGGTTAT ATTAAGAACA ATCAGAAGTT CAAGGACAAG GCCACCTTGA CTGCAGACAA
241 ATCCTCCAAC ACAGCCTACA TGCAGCTGAA CAGCCTGACA TATGAGGACT CTGCAGTCTA
301 TTACTGTACA AGAGAAGGGA TAACTGGGTT TACTTACTGG GGCCAAGGGA CTCTGGTCAC
361 CGTCTCCAGT
  
```

Secuencia de aminoácido:

EVQLQQSGAELAKPGASVKLSCKTSGYNFPIYWMHWVKQRPGRGLEWIGYINPSTGY
 IKNNQKFKDKATLTADKSSNTAYMQLNSLTIEDSAVYYCTREGITGFTYWGGQTLVT
 VSS

CDR1: IYWMHWVKQRPGRGLE

CDR2: NQKFKD

CDR3: EGITGFTY

Fig. 16E, Continuación

MF1898: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGGAGGCG TGGTCCAGCC
61  TGGGAGGTCC CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTG ACCTTCAGTA GCTATGGCAT
121 GCACTGGGTC CGCCAGGCTC CAGGCAAGGG GCTGGAGTGG GTGGCAGTTA TATCATATGA
181 TGGAAGTAAT AAATACTATG CAGACTCCGT GAAGGGCCGA TTCACCATCT CCAGAGACAA
241 TTCCAAGAAC ACGCTGTATC TGCAAATGAA CAGCCTGAGA GCTGAGGACA CGGCCGTGTA
301 TTACTGTGCA AAAGATGGTT TCCGTCGTAC TACTCTGTCT GGCTTTGATT ATTGGGGCCA
361 AGGTACCCTG GTCACCGTCT CCAGT
  
```

Secuencia de aminoácido:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
 NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGFRRTTLSGFDYW
 GQGT LVT VSS

CDR1: SYGMH

CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG

CDR3: DGFRRTTLSGFDY

Fig. 16E, Continuación

MF3003: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-2

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GAAGCAGTCT GGACCTGAGC TGGTGAAGCC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGATTT CCTGCAAGGC TTCTGGCGAC GCATTCAGTT ACTCCTGGAT
121 GAACTGGGTG AAGCAGAGGC CTGGAAAGGG TCTTGAGTGG ATTGGACGGA TTTATCCTGG
181 AGATGGAGAT ATTA ACTACA ATGGGAAGTT CAAGGGCAAG GCCACACTGA CTGCAGACAA
241 ATCCTCCAGC ACAGCCCACC TGCAACTCAA CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCGGTCTA
301 CTTCTGTGCA AGAGGACAGC TCGGACTAGA GGCCTGGTTT GCTTATTGGG GCCAGGGGAC
361 TCTGGTCACC GTCTCCAGT
  
```

Secuencia de aminoácido:

QVQLKQSGPELVKPGASVKISCKASGDAFSYSWMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPGDG
 DINYNGKFKGKATLTADKSSSTAHLQLNSLTSEDSAVYFCARGQLGLEAWFAYWGQ
 GTLVTVSS

CDR1: YSWMNWVKQRPKGKLE

CDR2: NGKFKG

CDR3: GQLGLEAWFAY

Fig. 16E, Continuación

Secuencias de Ab específico para HER3

MF2913: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-3

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

MF6058: heavy chain variable region sequence of an erbB-3 binding antibody

Nucleic acid sequence (underlined sequence encodes end of leader peptide):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGACG TGAAGAAGCC
61 TGGGGCCTCA GTGAAGGTCA CGTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCCC CTGGACAAGC TCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTCA
181 AAGTGTGTTG ACAAATATG CAAAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCTCTATGA CCAGGGAGAC
241 GTCCACAAGC ACAGCCTACA TGCAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCTACGTA
301 TTACTGTGCA AGAGATCATG GTTCTCGTCA TTTCTGGTCT TACTGGGGCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T
  
```

Secuencia de aminoácido:

QVQLVQSGADVKKPGASVKVTCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQALEWMGWINPQS
GGTNYAKKFQGRVSMRETSTSTAYMQLSRLRSDDTATYYCARDHGSRHFWSYWGFDYWGQGTLVTVSS

CDR1: GYYMH

CDR2: WINPQSGGTNYAKKFQG

CDR3: DHGSRHFWSYWGFDY

Fig. 16E, Continuación

MF6061: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-3

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61 TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCG GCTACTATAT
121 GCACTGGGTG CGACAGGCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCTCA
181 GAGTGGTGGC ACAAACCTATG CACAGAAGTT TAAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241 GTCCACCAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGACGACA CGGCTGTGTA
301 TTACTGTGCA AGAGATCATG GTTCTCGTCA TTTCTGGTCT TACTGGGGCT TTGATTATTG
361 GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

```

Secuencia de aminoácido:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPQS
GGTNYAQKFKGRVTMTRDTSTSTAYMELSRLSDDTAVYYCARDHGSRHFWSYWGFDY
DYWGQGTLLVTVSS

CDR1: GYYMH
CDR2: WINPQSGGTNYAQKFKG
CDR3: DHGSRHFWSYWGFDY

Fig. 16E, Continuación

MF6065: secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo de unión erbB-3

Secuencia de ácido nucleico (secuencia subrayada codifica el extremo del péptido líder):

```

1  GGCCCAGCCG GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGCTGAGG TGAAGAAGCC
61  TGGGGCCTCA GTGAAGGTCT CCTGCAAGGC TTCTGGATAC ACCTTCACCT CTTACTATAT
121  GCACTGGGTG CGACAGGCCC CTGGACAAGG GCTTGAGTGG ATGGGATGGA TCAACCCTCA
181  GGGGGGTTCT ACAAATATG CACAGAAGTT TCAGGGCAGG GTCACGATGA CCAGGGACAC
241  GTCCACCAGC ACAGTGTACA TGGAGCTGAG CAGGCTGAGA TCTGAGGACA CGGCTGTGTA
301  TTACTGTGCA AGAGATCATG GTTCTCGTCA TTTCTGGTCT TACTGGGGCT TTGATTATTG
361  GGGCCAAGGT ACCCTGGTCA CCGTCTCCAG T

```

Secuencia de aminoácido:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPQG
GSTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSRLRSEDVAVYYCARDHGSRHFWSYWGFDYWGQGTLVTVSS

CDR1: SYMH

CDR2: WINPQGGSTNYAQKFQG

CDR3: DHGSRHFWSYWGFDY

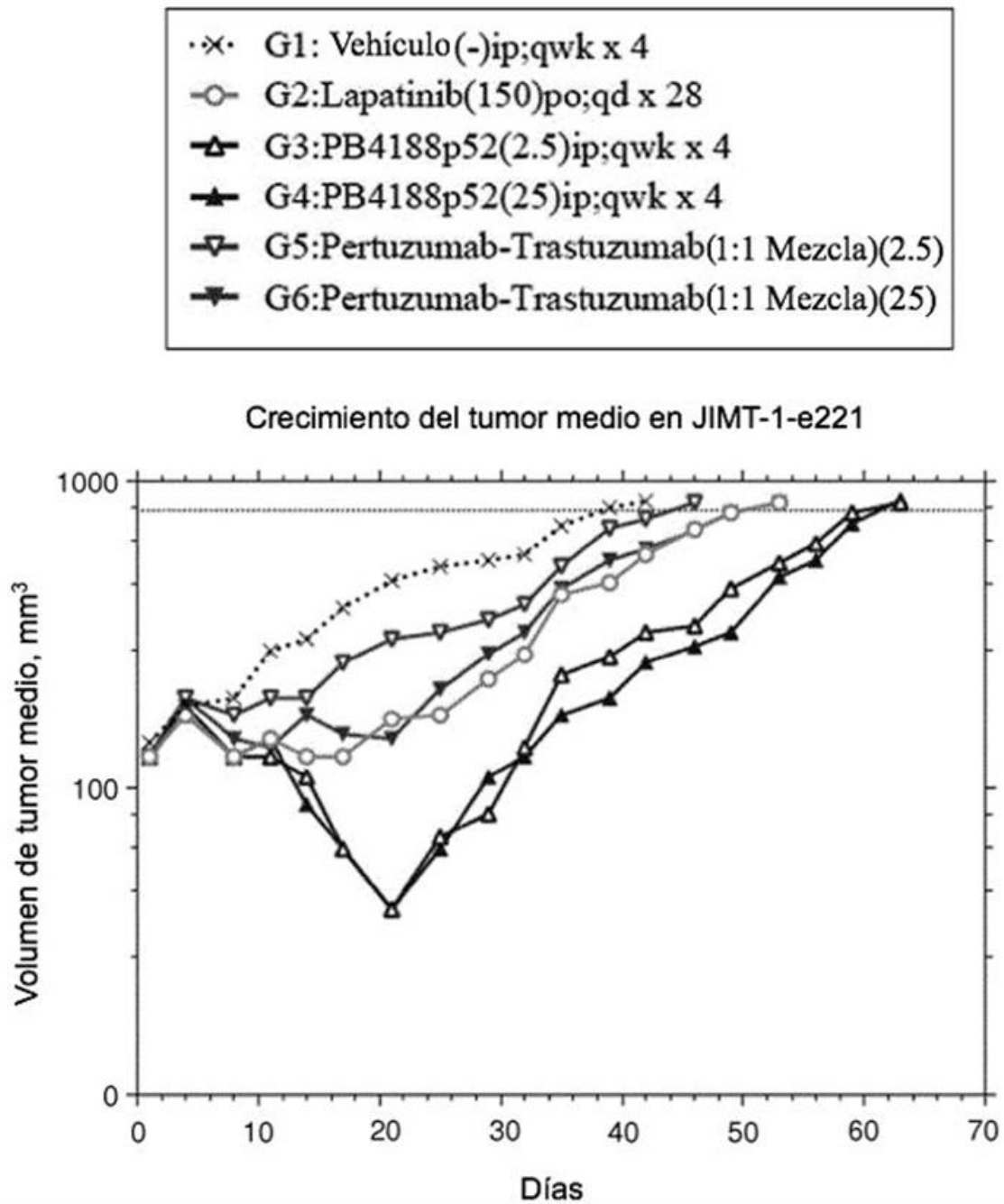


Fig. 17

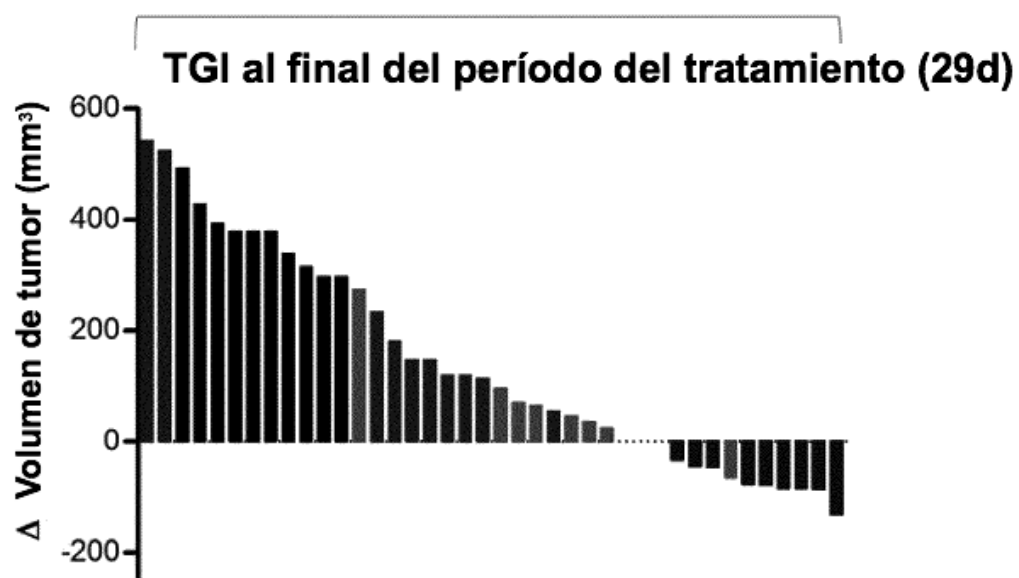


Fig. 17, Continuación

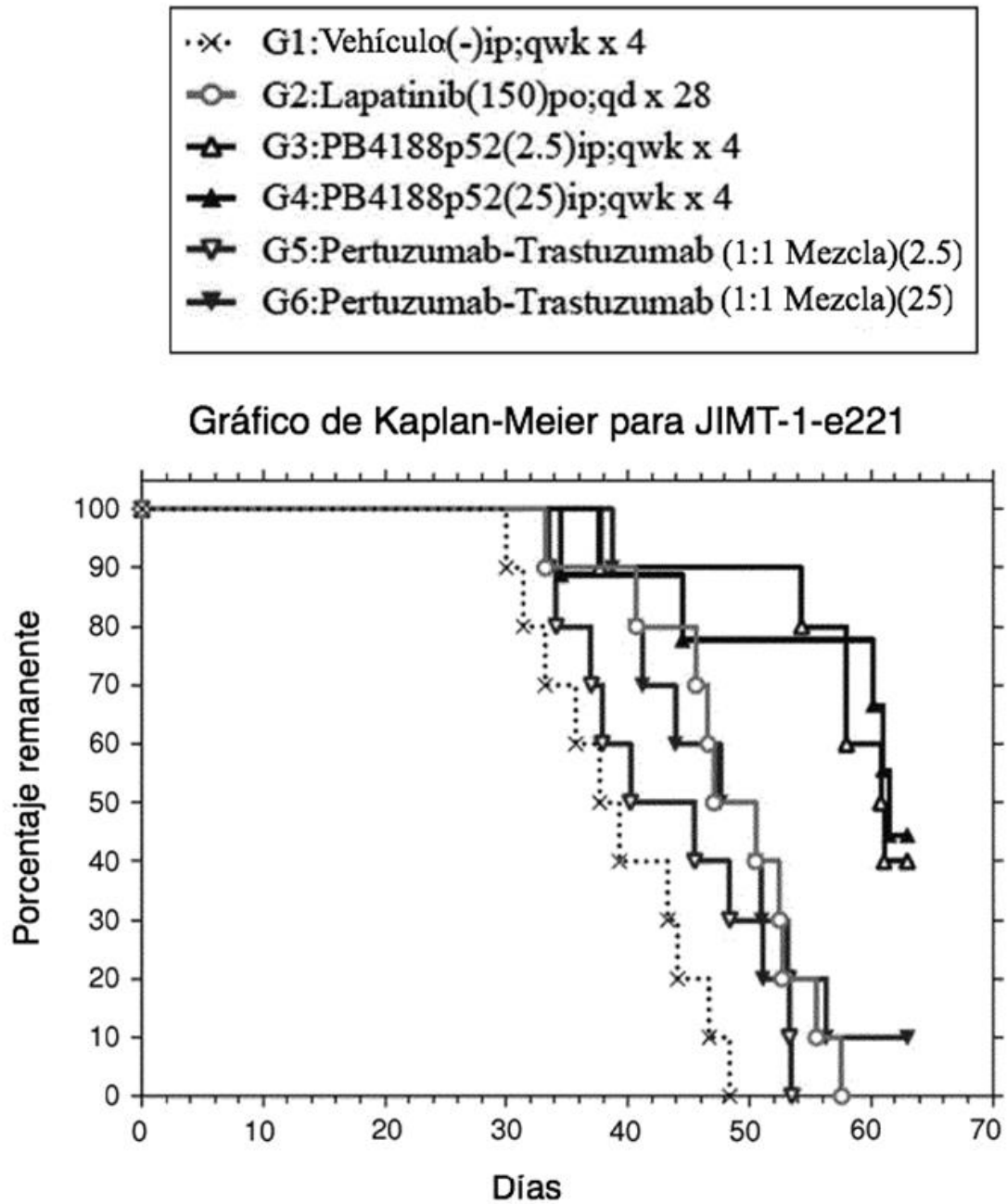


Fig. 18

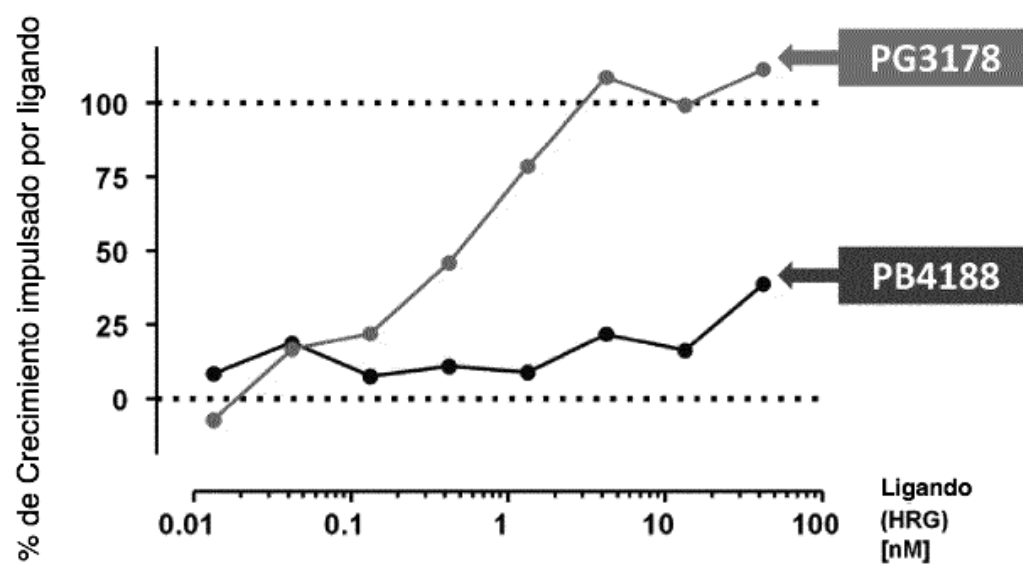


Fig. 19

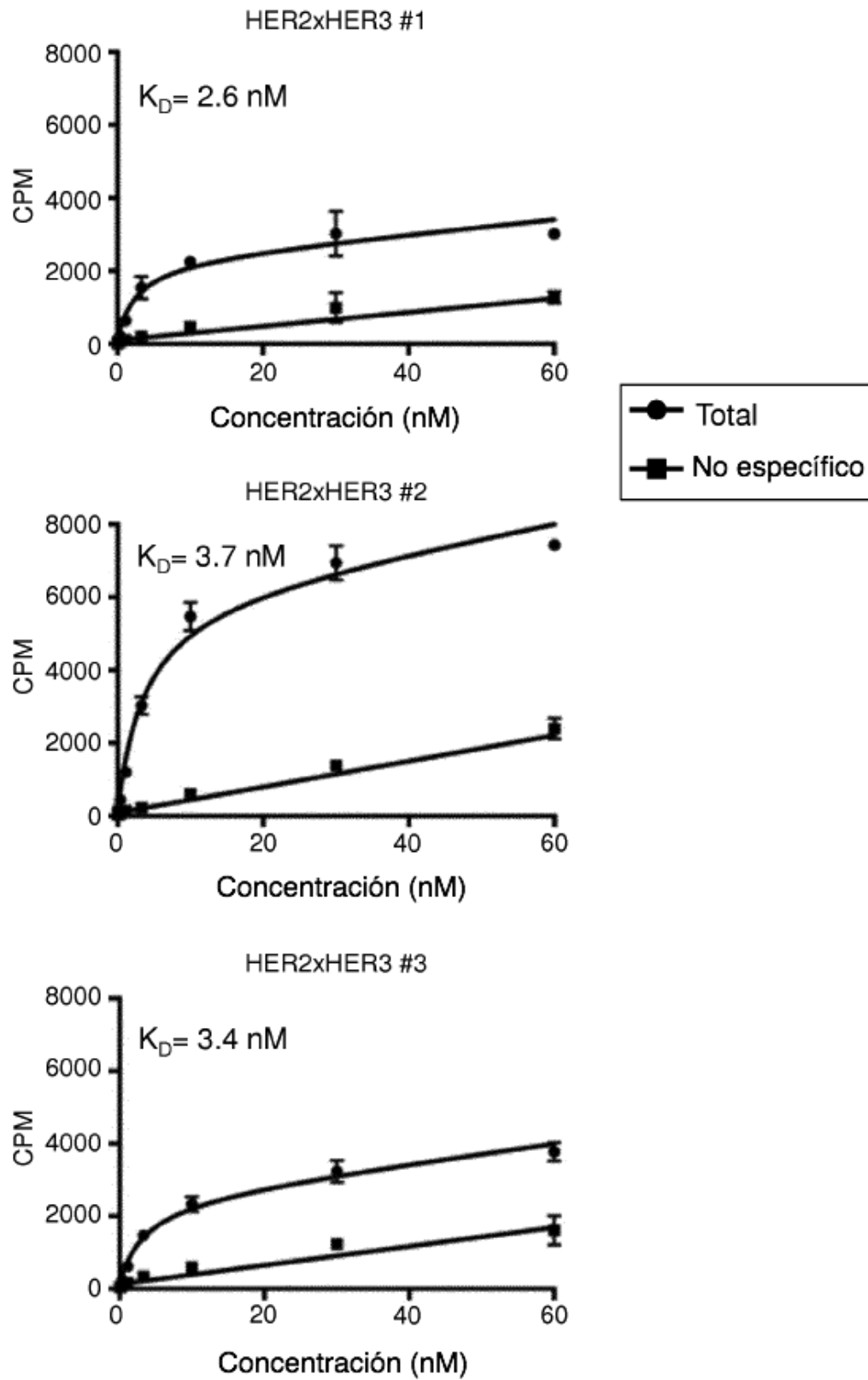


Fig. 20

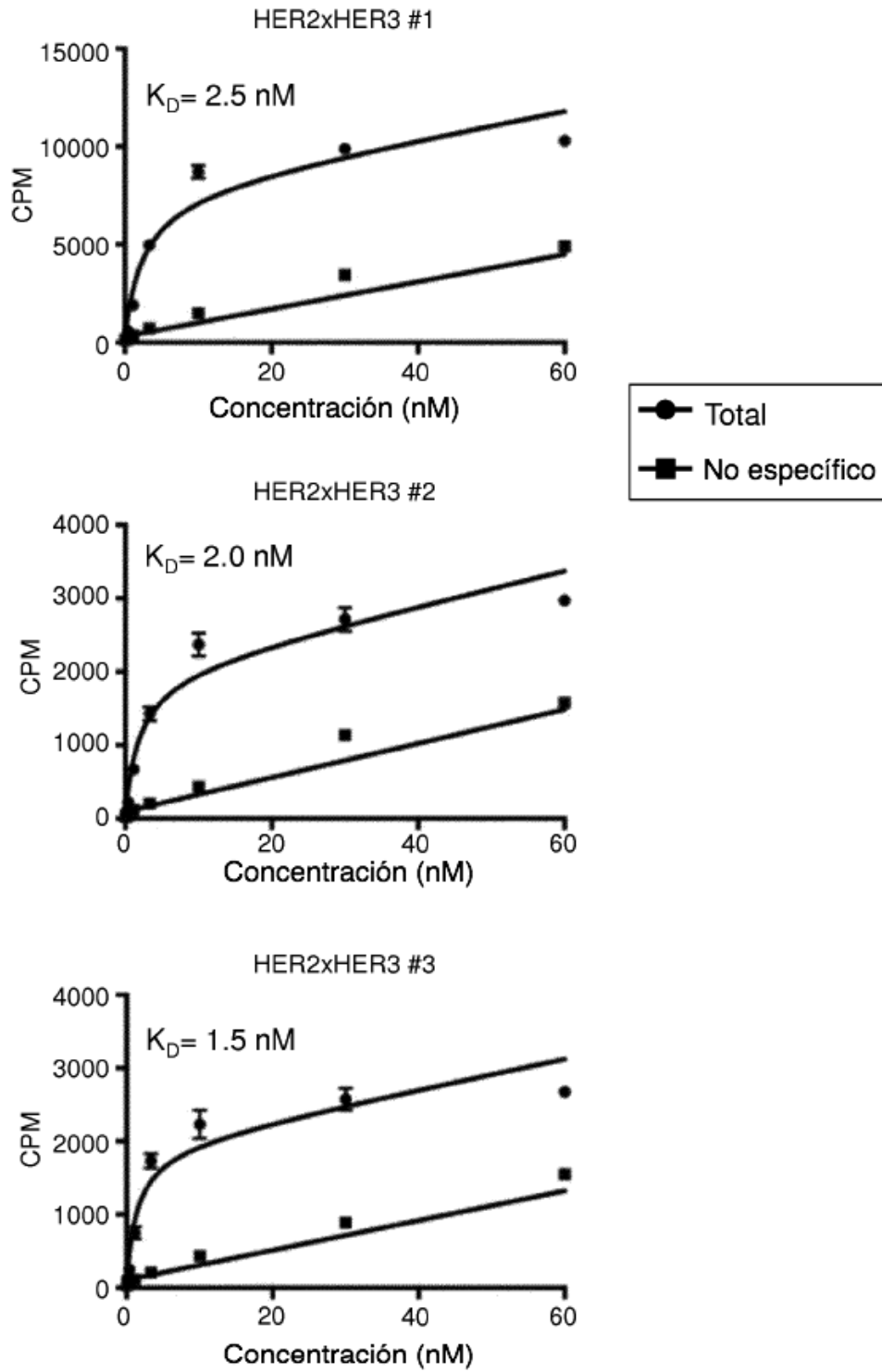


Fig. 20, Continuación

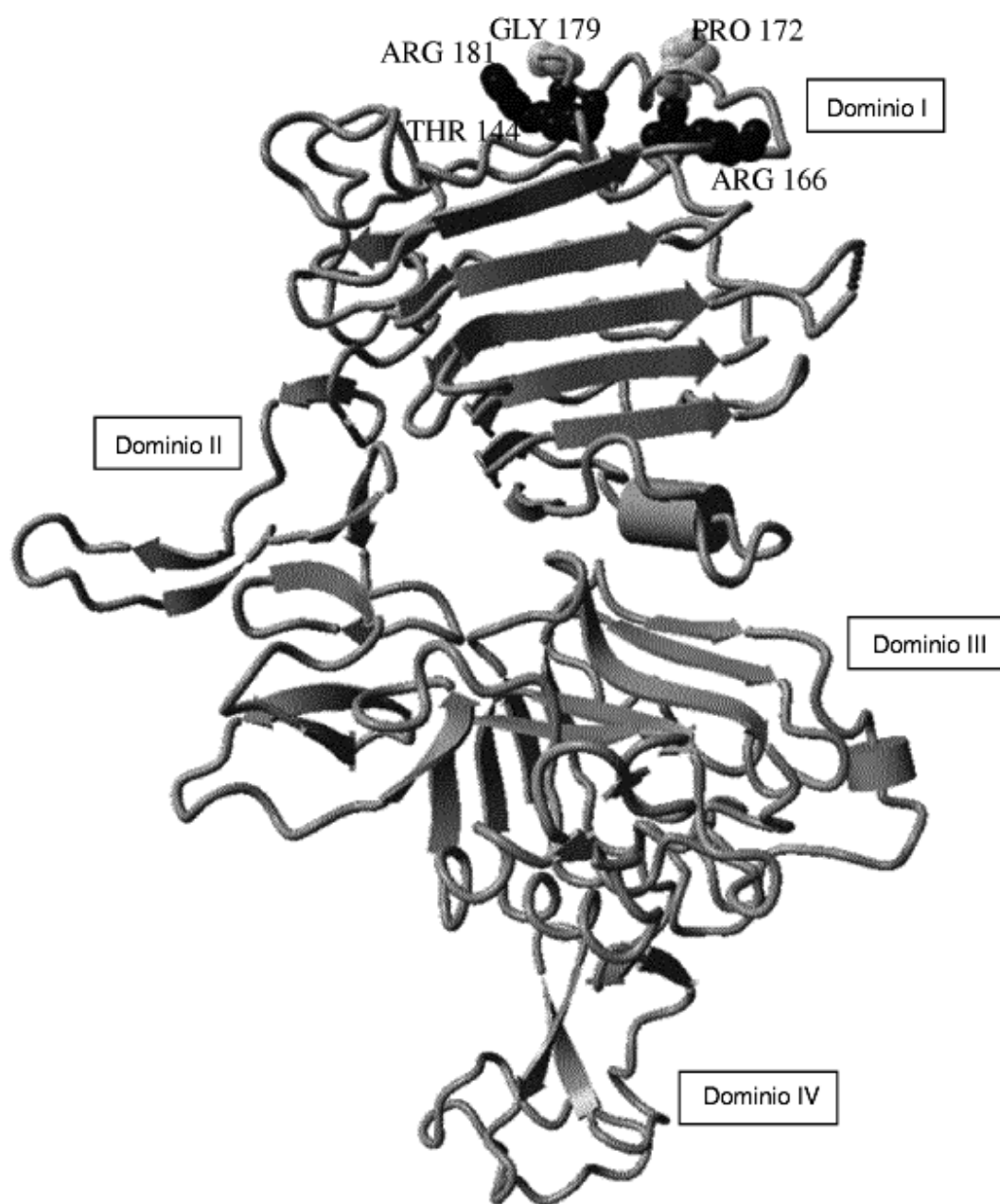


Fig. 21A

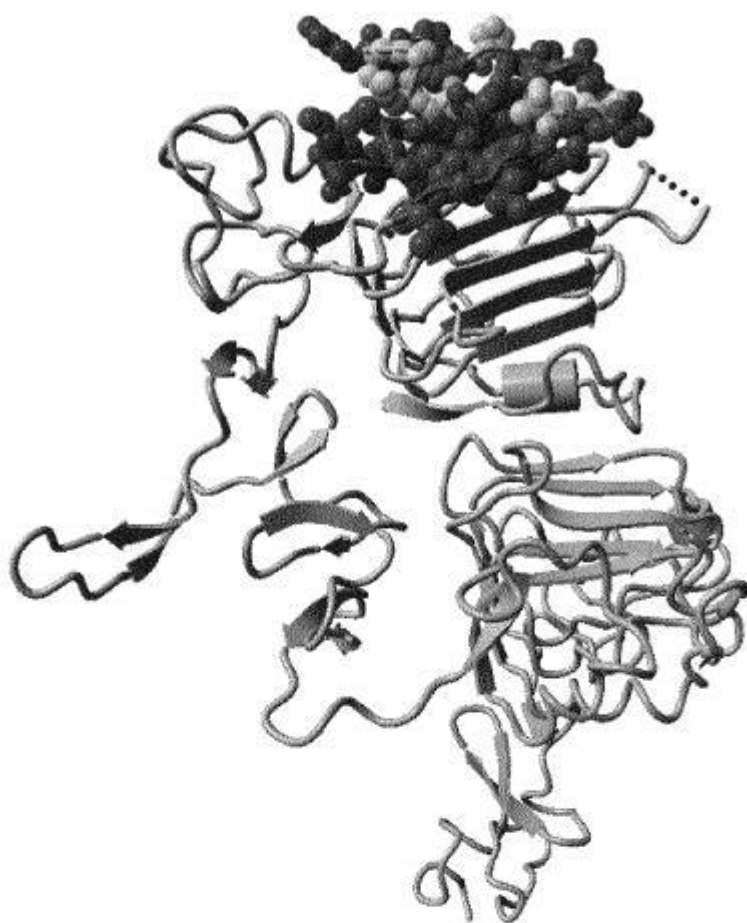


Fig. 21B (a)

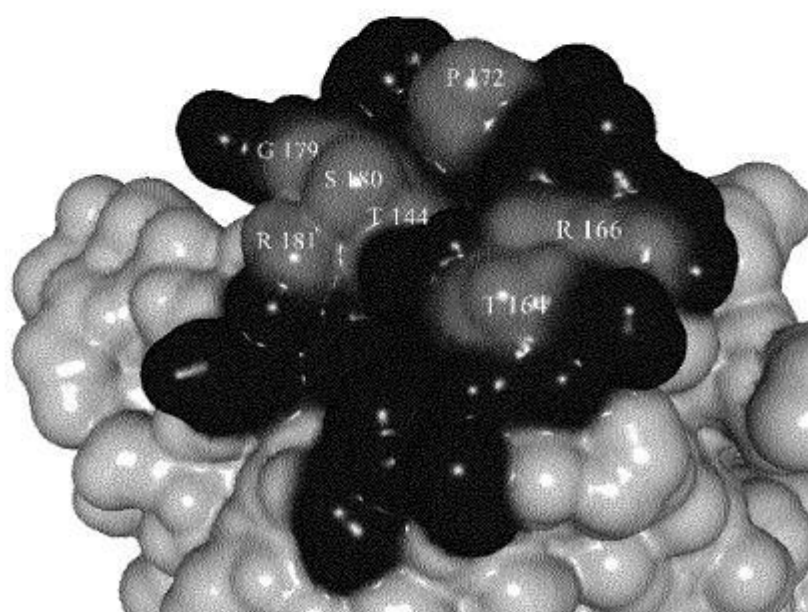


Fig. 21B (b)

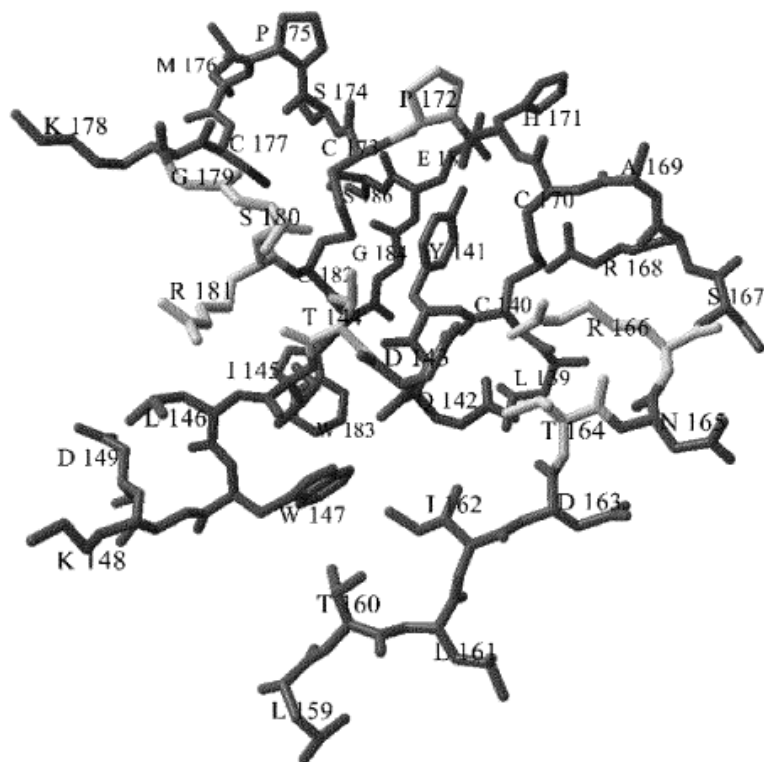


Fig. 21B (c)

139 LCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSR CWGES 186

Fig. 21B (d)



Fig. 21C (a)

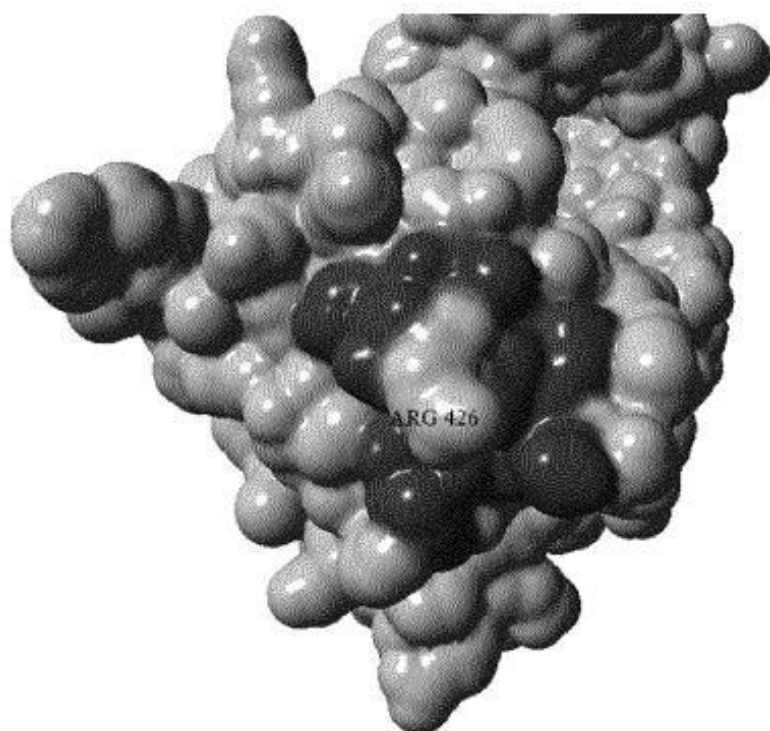


Fig. 21C (b)

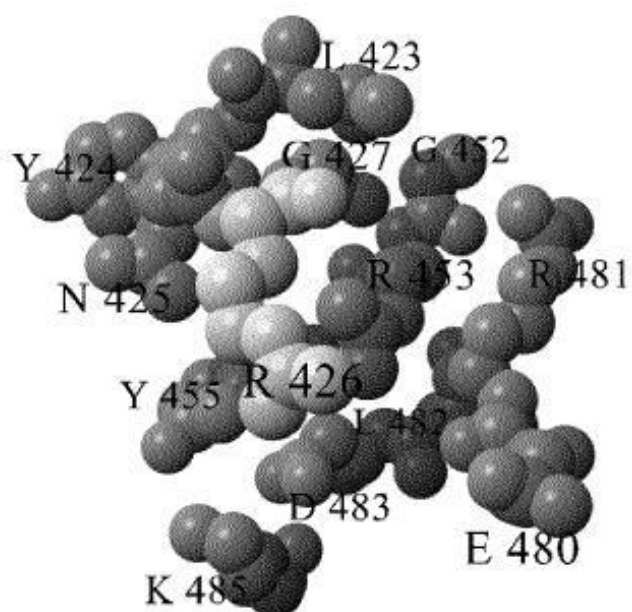


Fig. 21C (c)

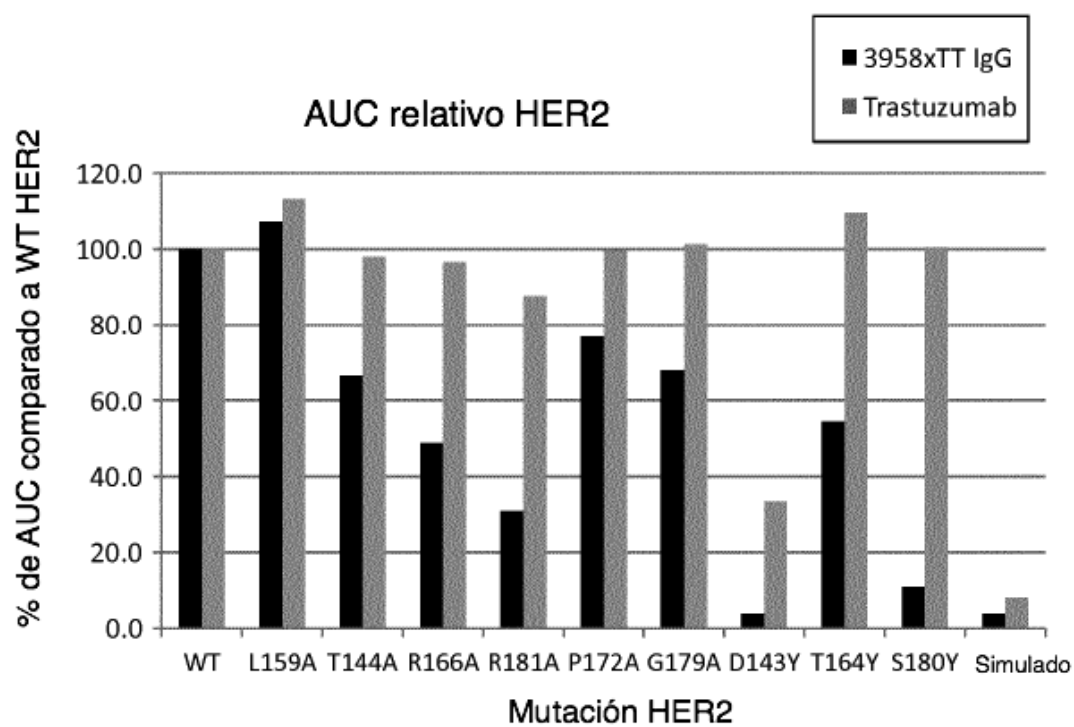


Fig. 22

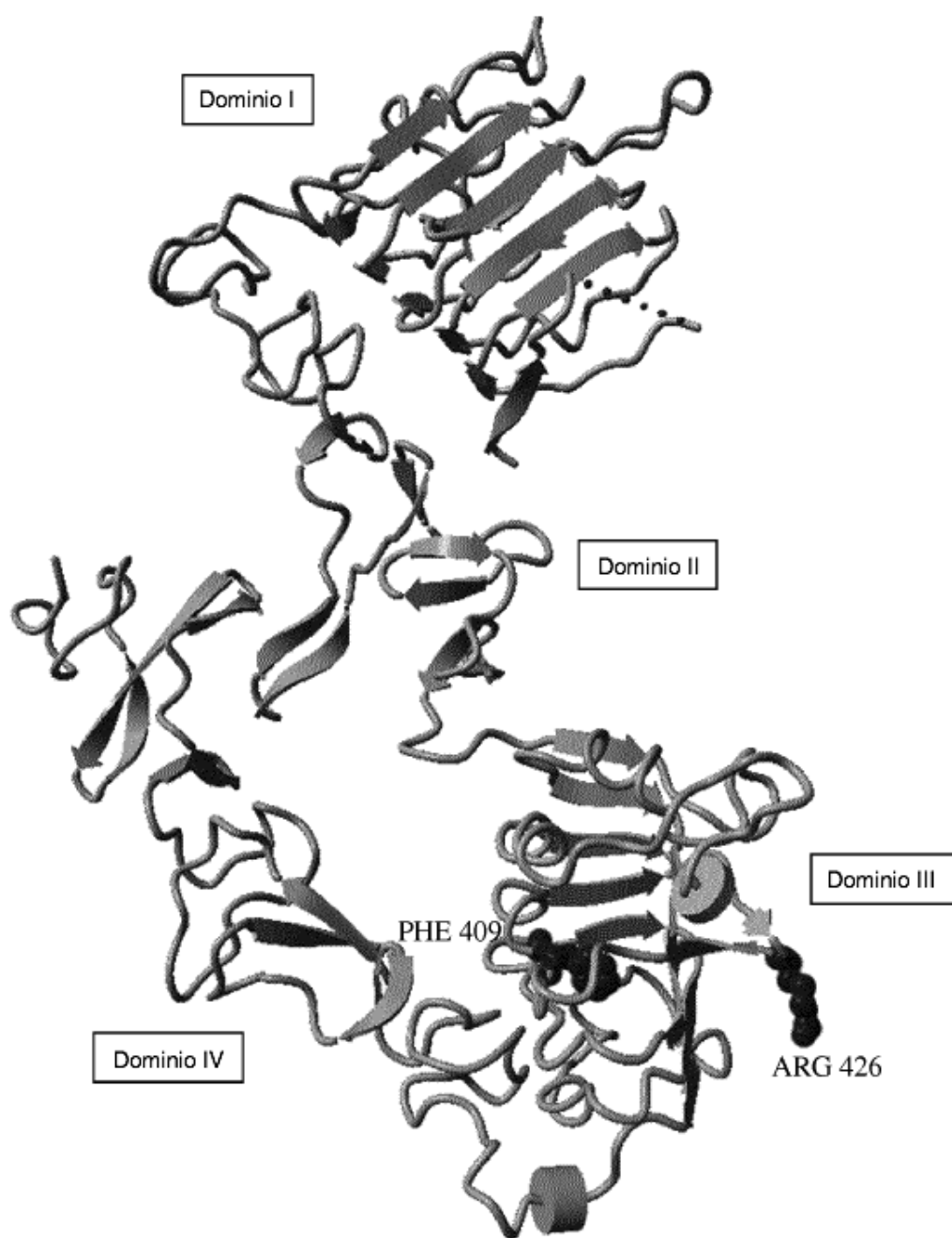


Fig. 23

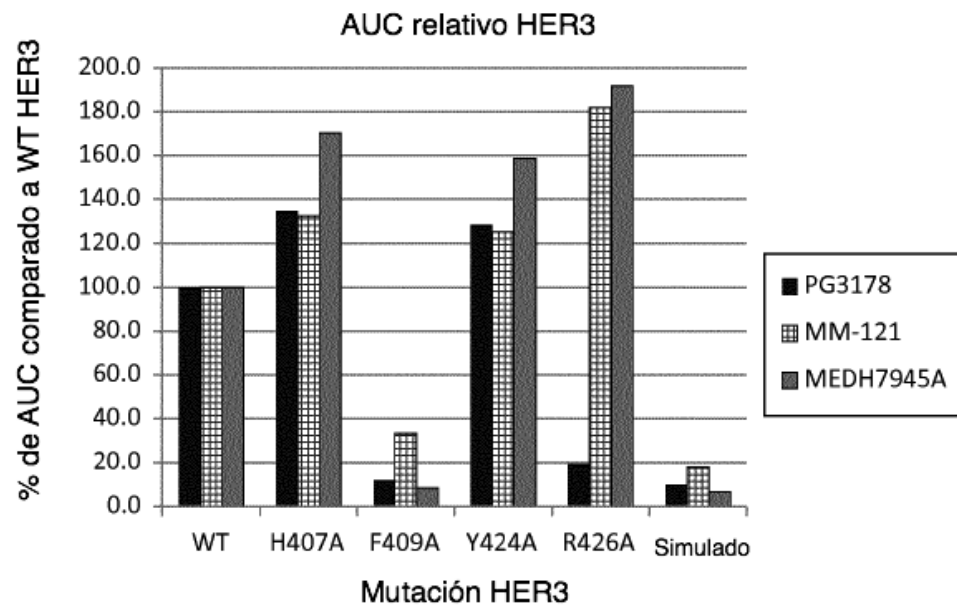


Fig. 24

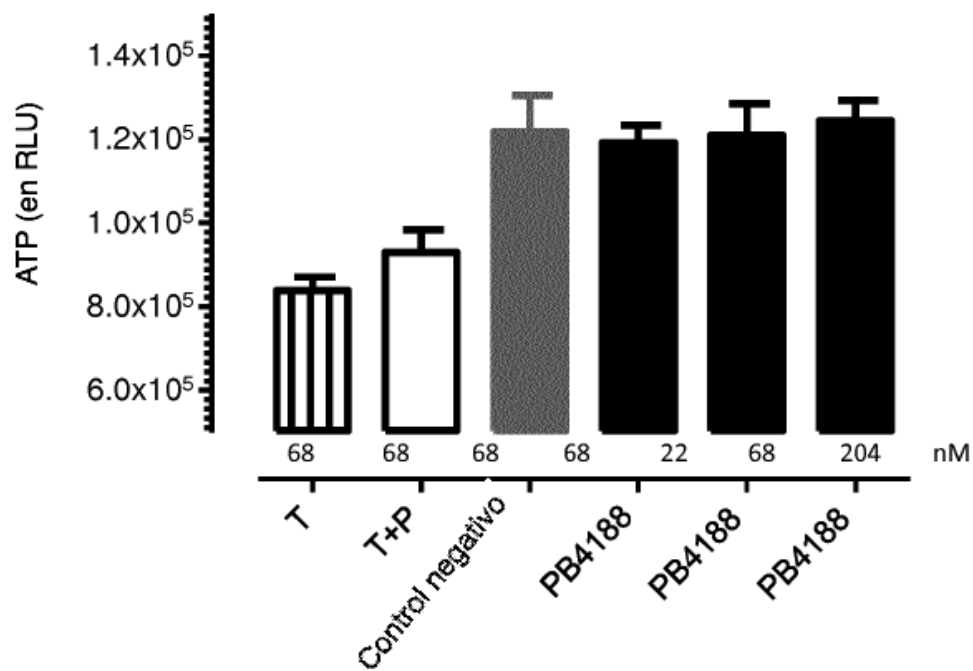


Fig. 25

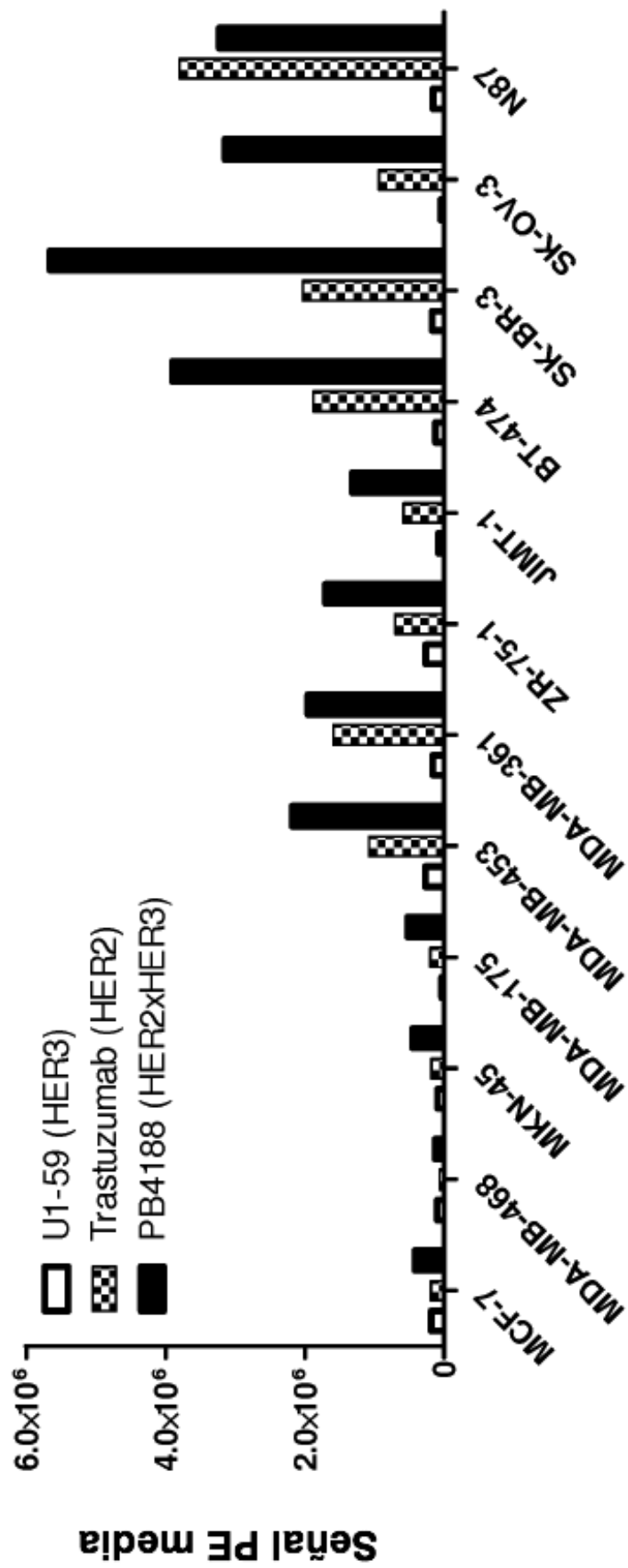


Fig. 26

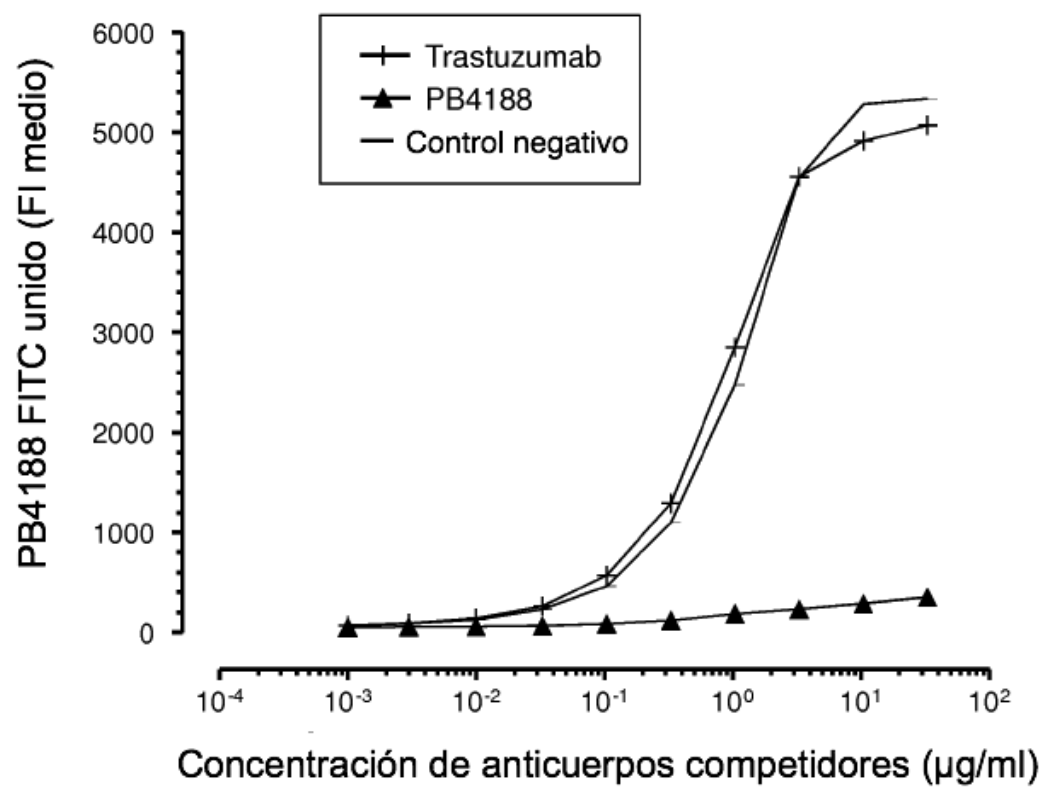


Fig. 27

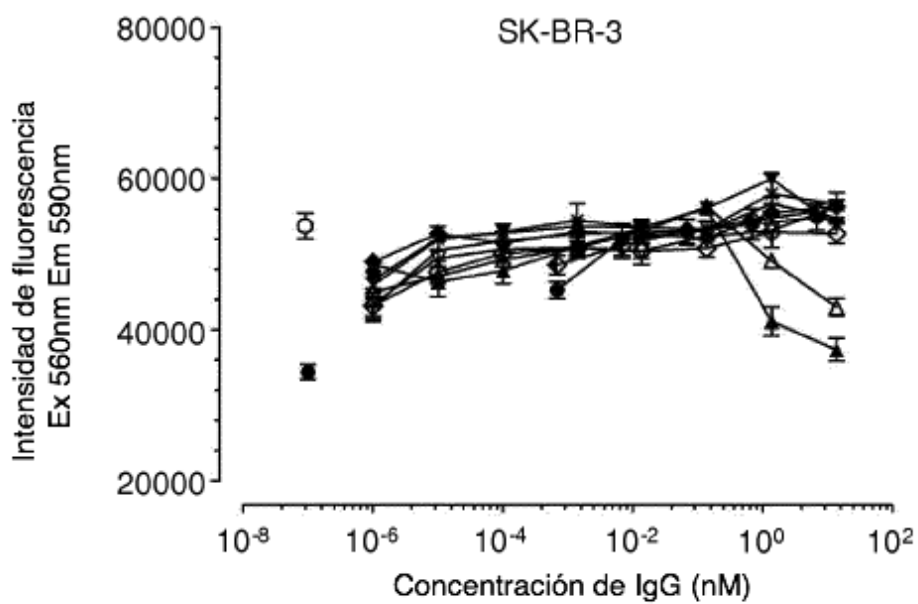
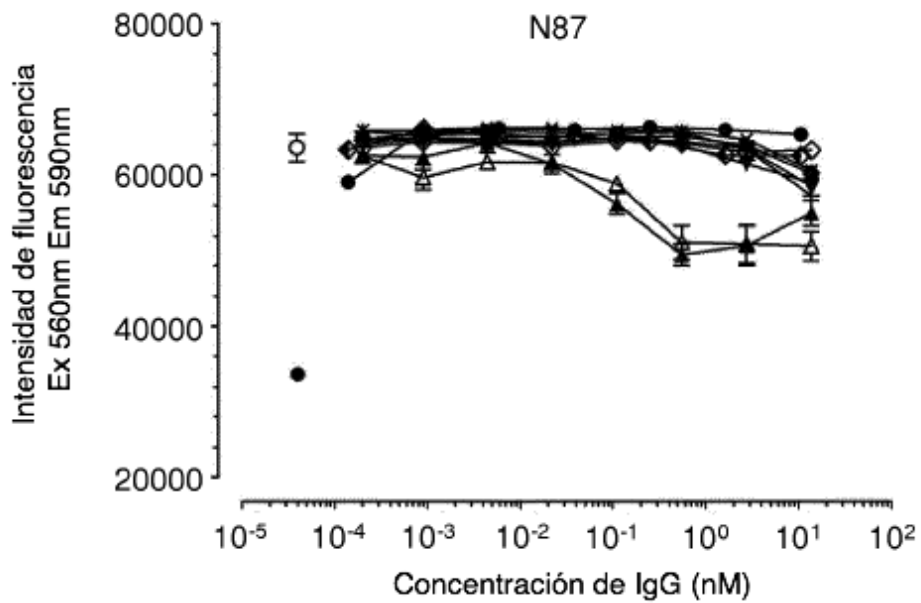
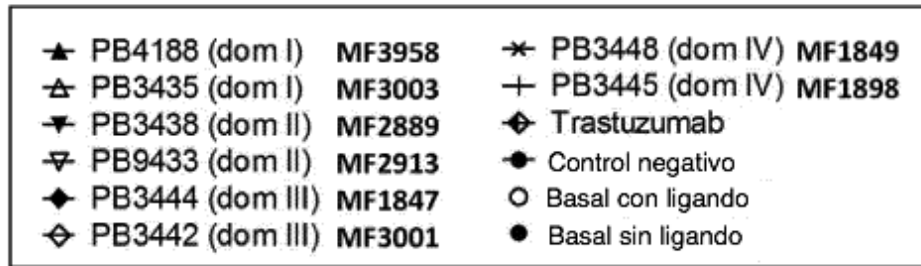


Fig. 28

▲ PB4188 (dom I) MF3958	✱ PB3448 (dom IV) MF1849
△ PB3435 (dom I) MF3003	+ PB3445 (dom IV) MF1898
▼ PB3438 (dom II) MF2889	◆ Trastuzumab
▽ PB9433 (dom II) MF2913	● Control negativo
◆ PB3444 (dom III) MF1847	○ Basal con ligando
◇ PB3442 (dom III) MF3001	● Basal sin ligando

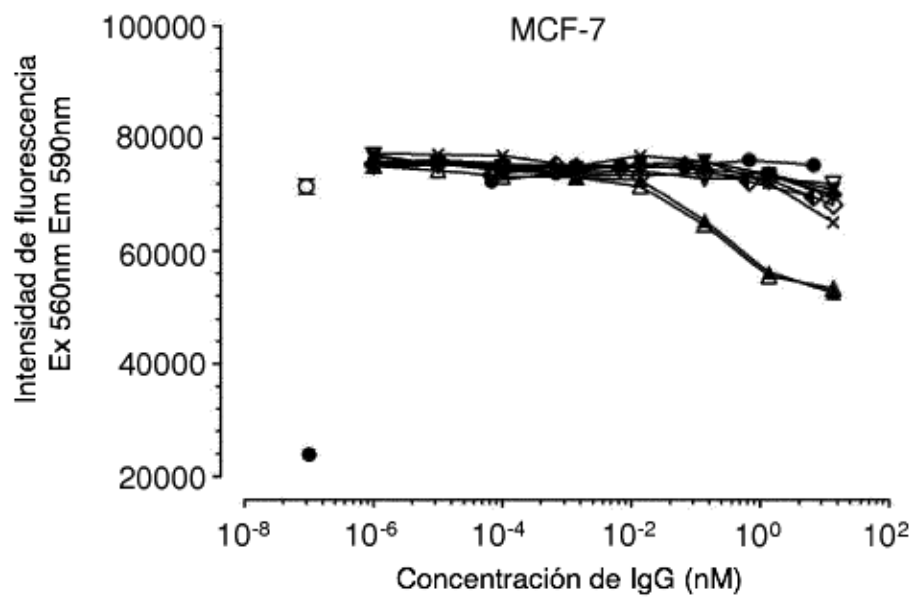


Fig. 28, Continuación

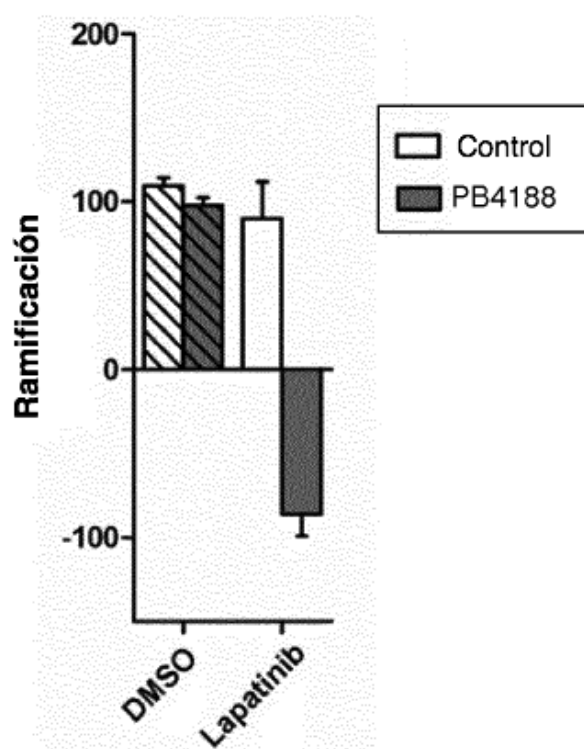
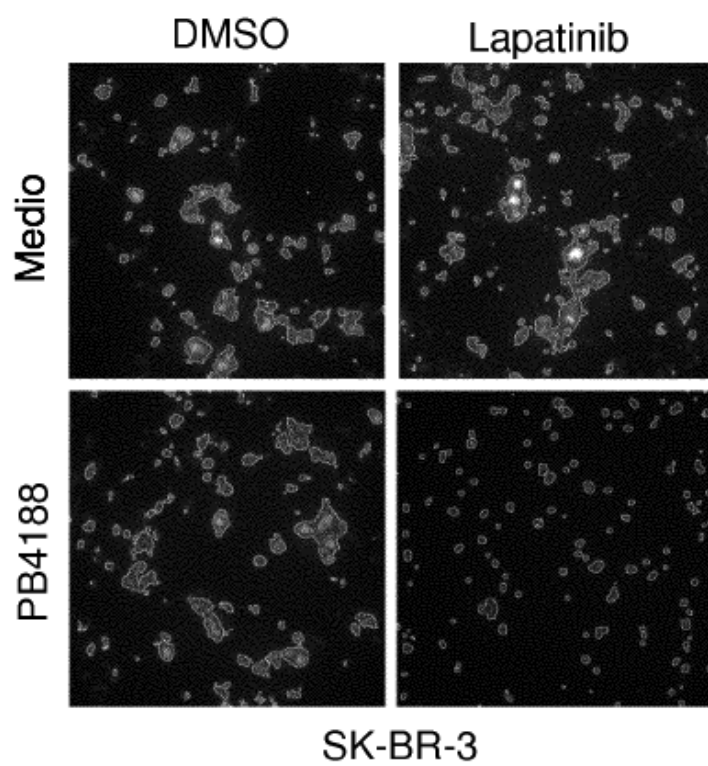


Fig. 29

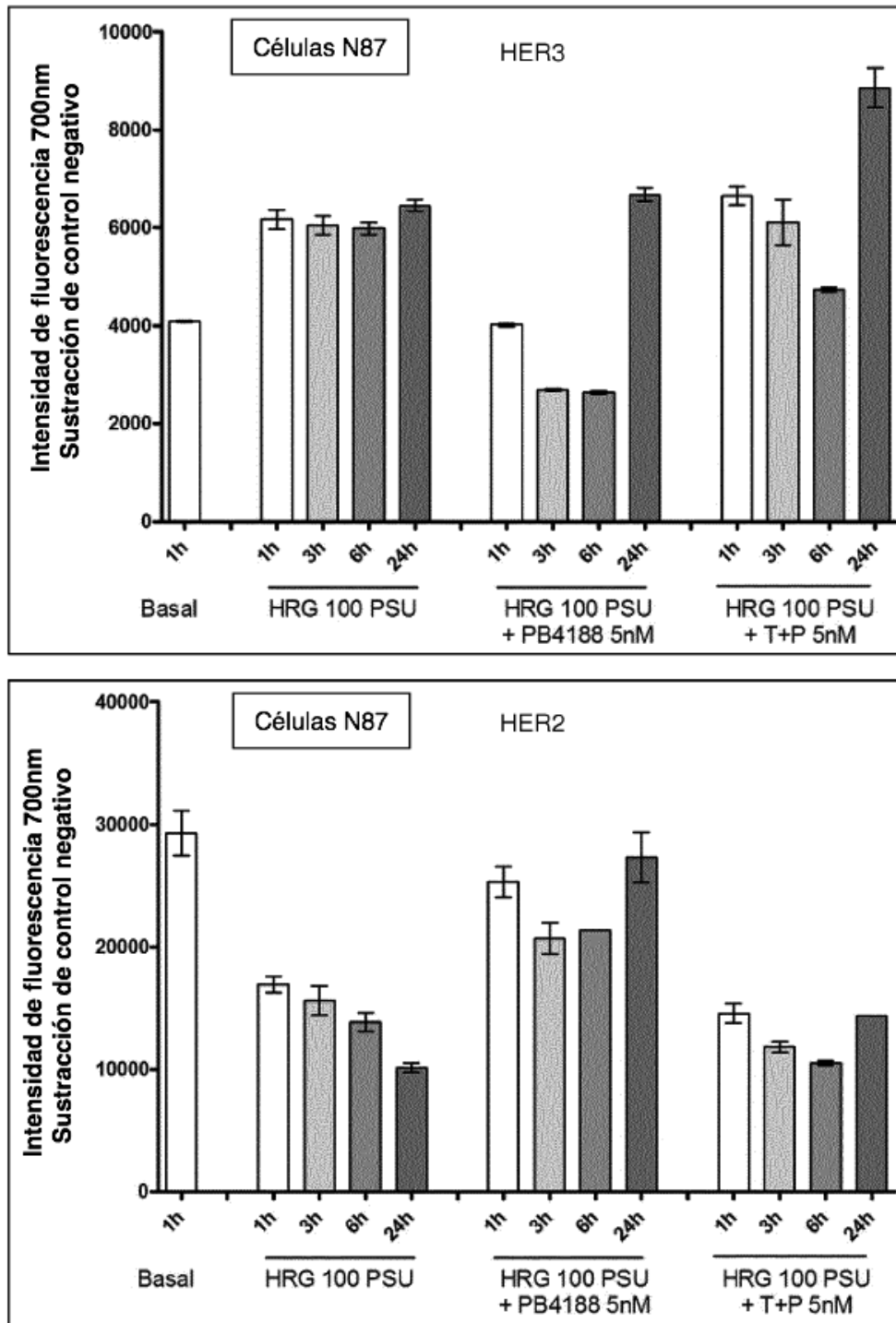


Fig. 30A

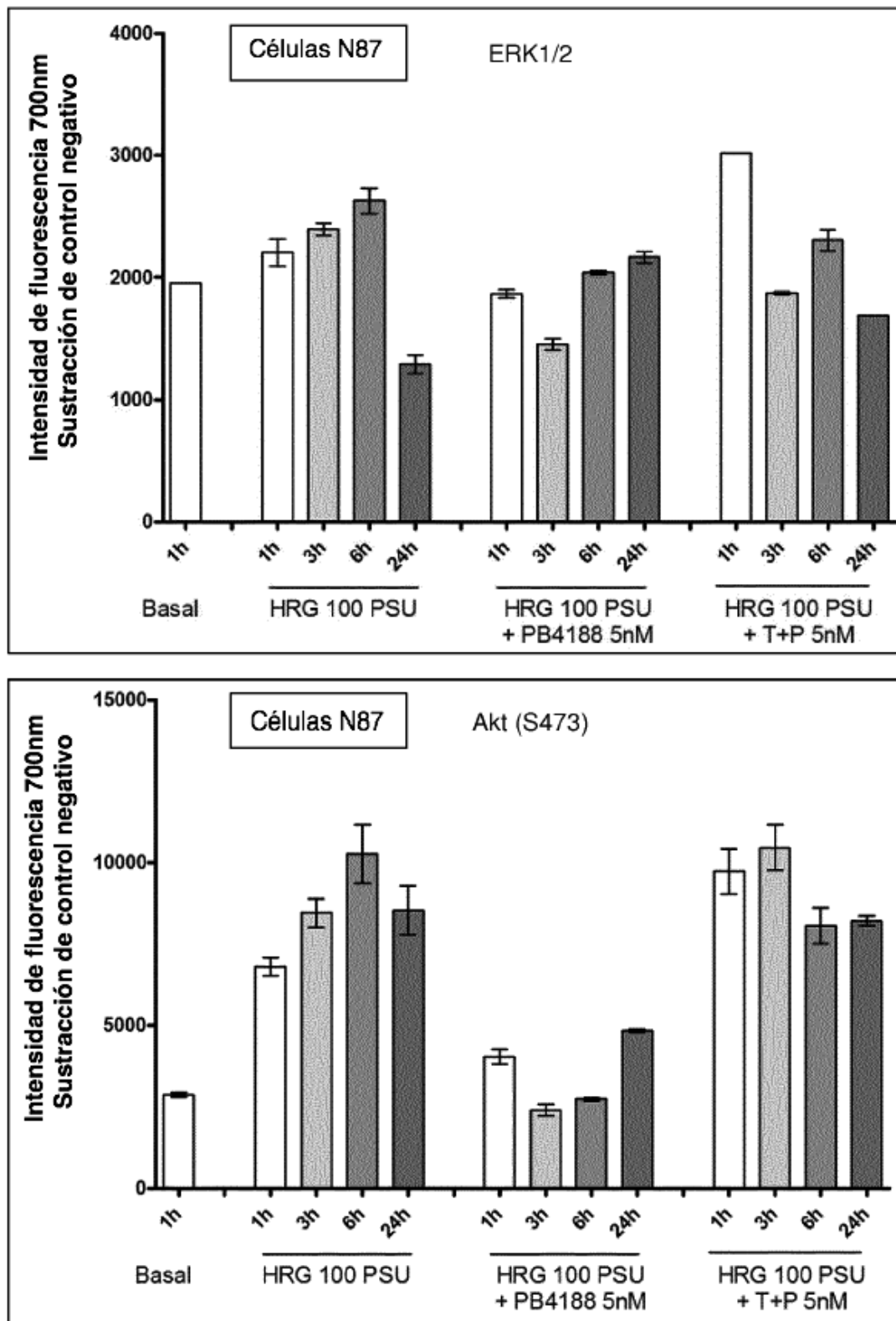


Fig. 30A, Continuación

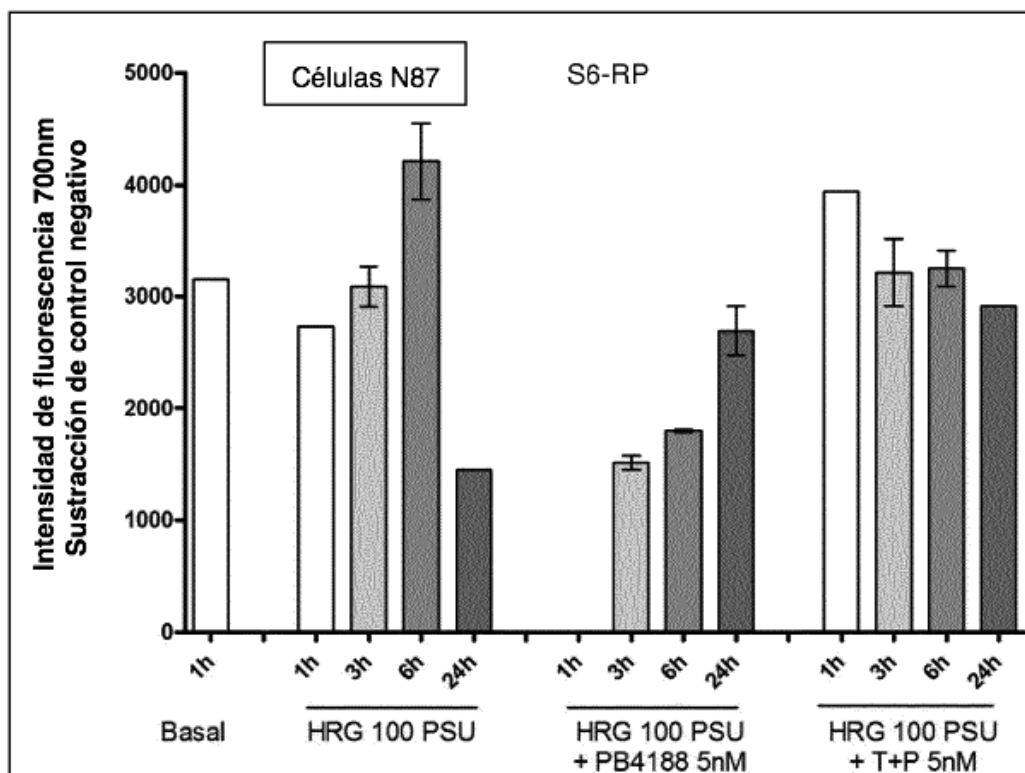


Fig. 30A, Continuación

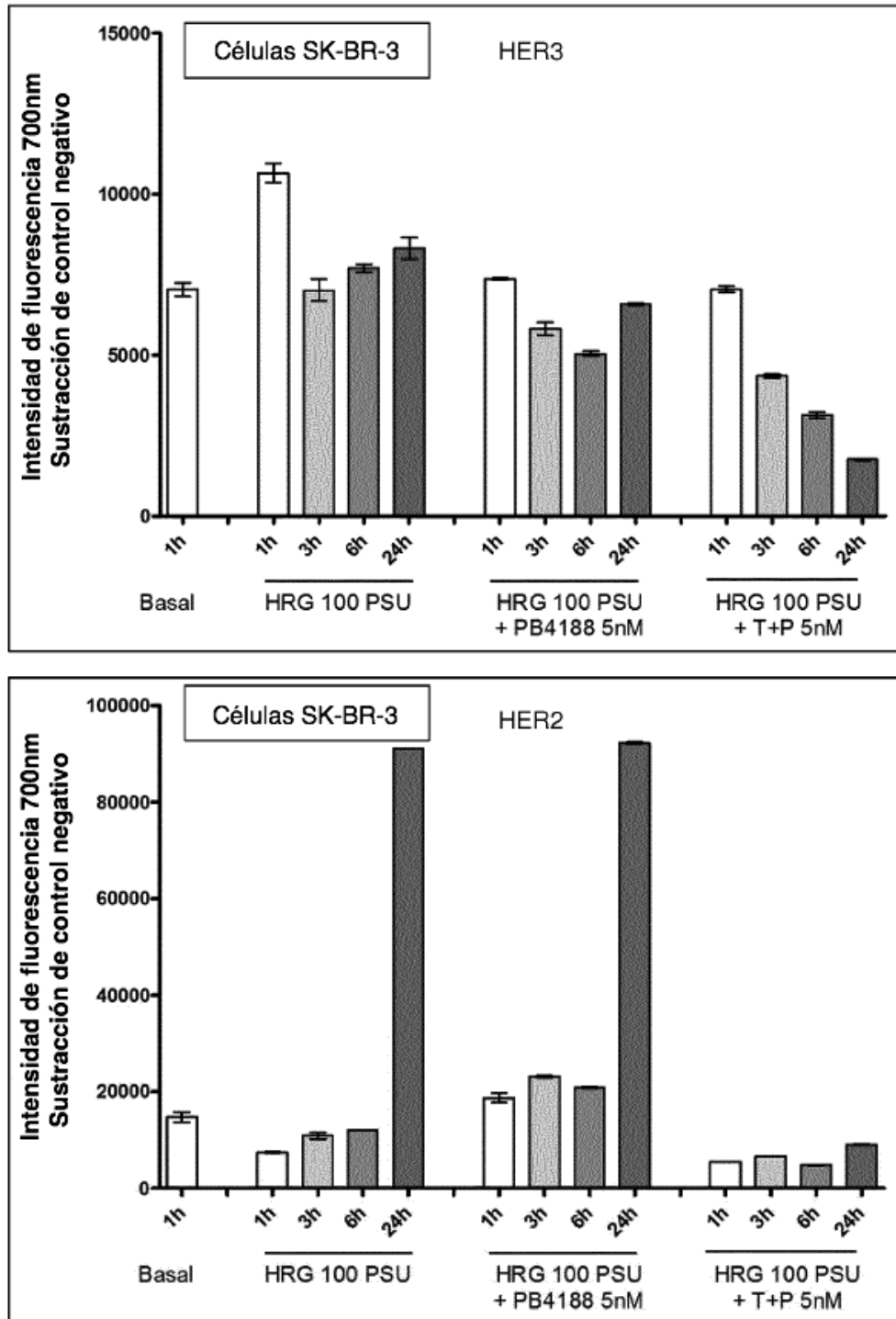


Fig. 30B

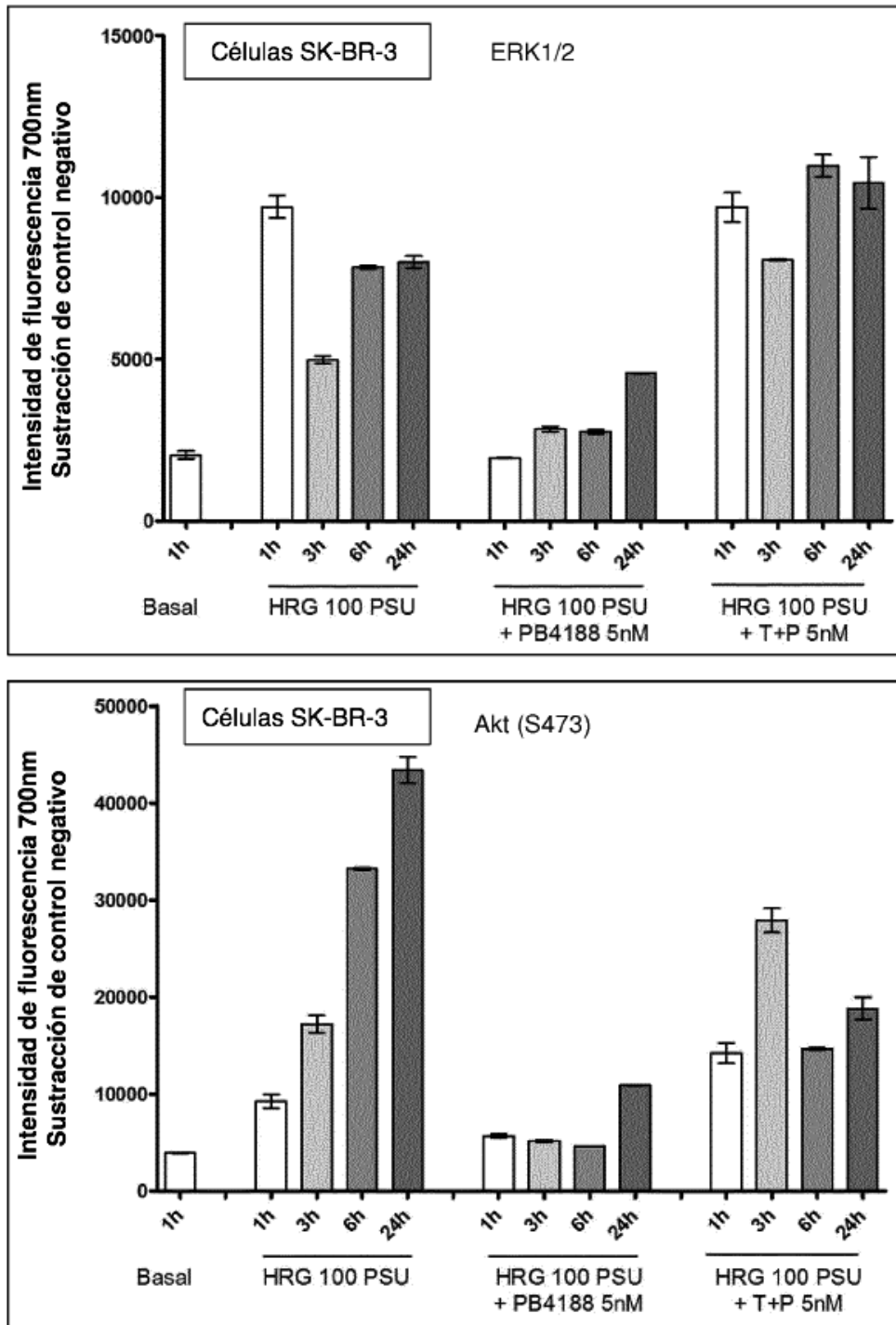


Fig. 30B, Continuación

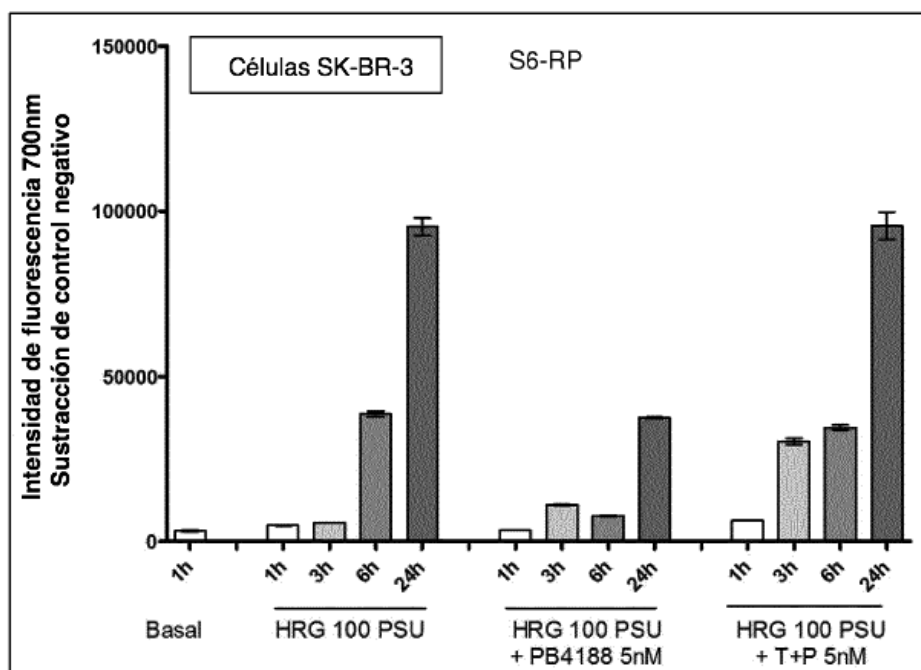


Fig. 30B, Continuación

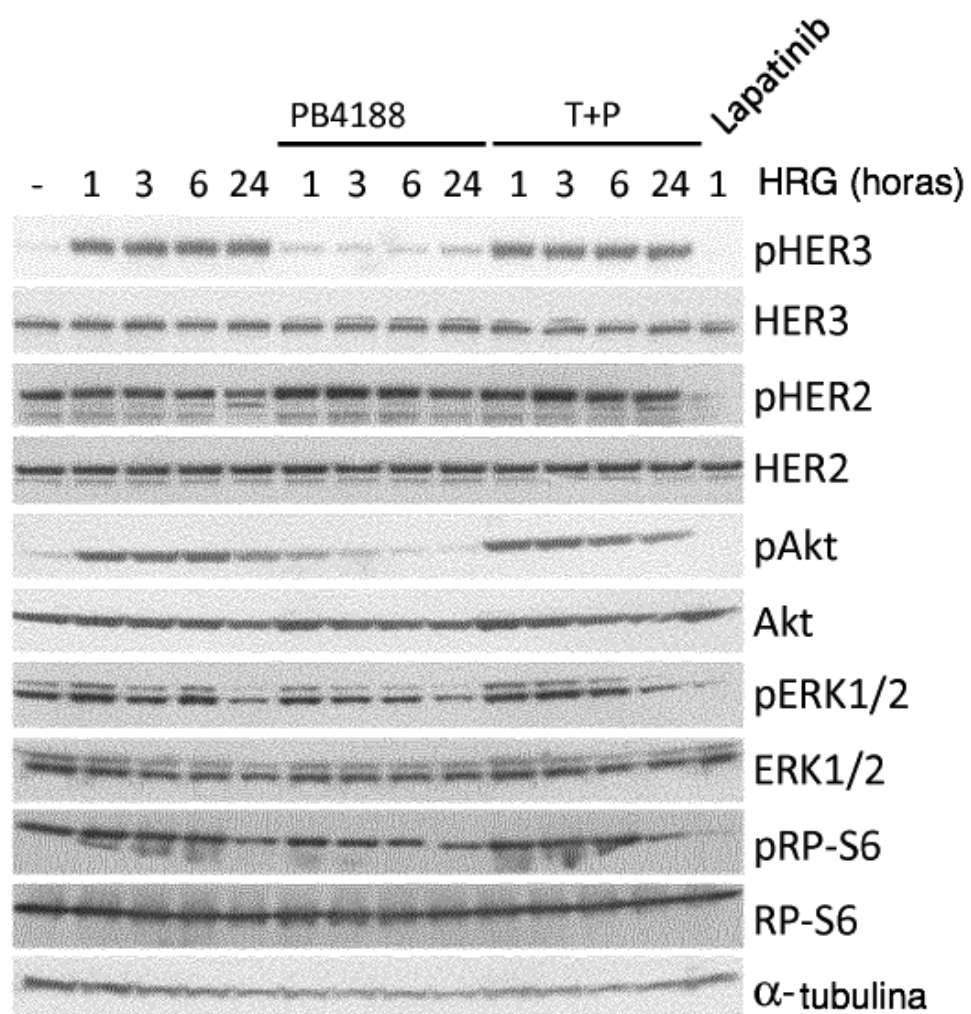


Fig. 31

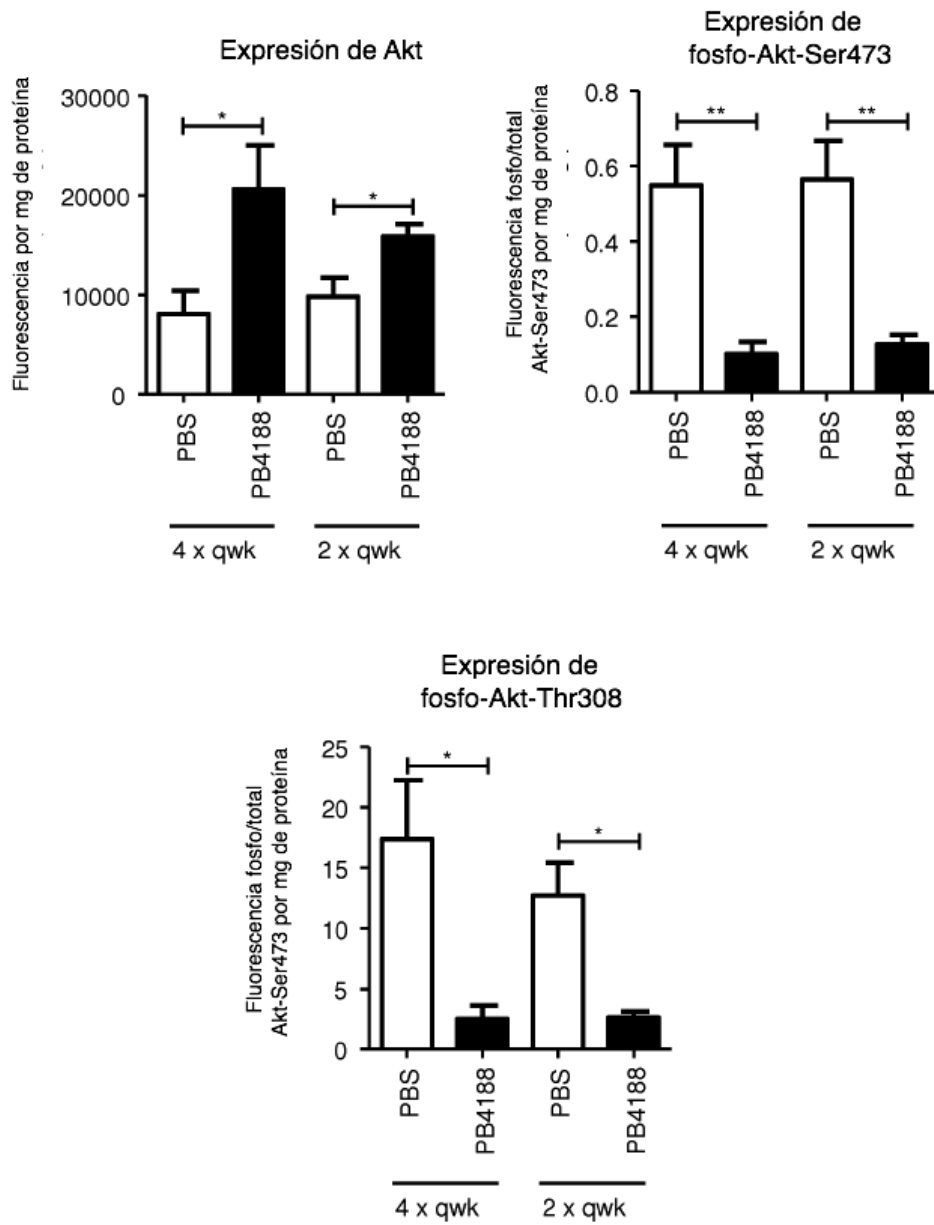


Fig. 32

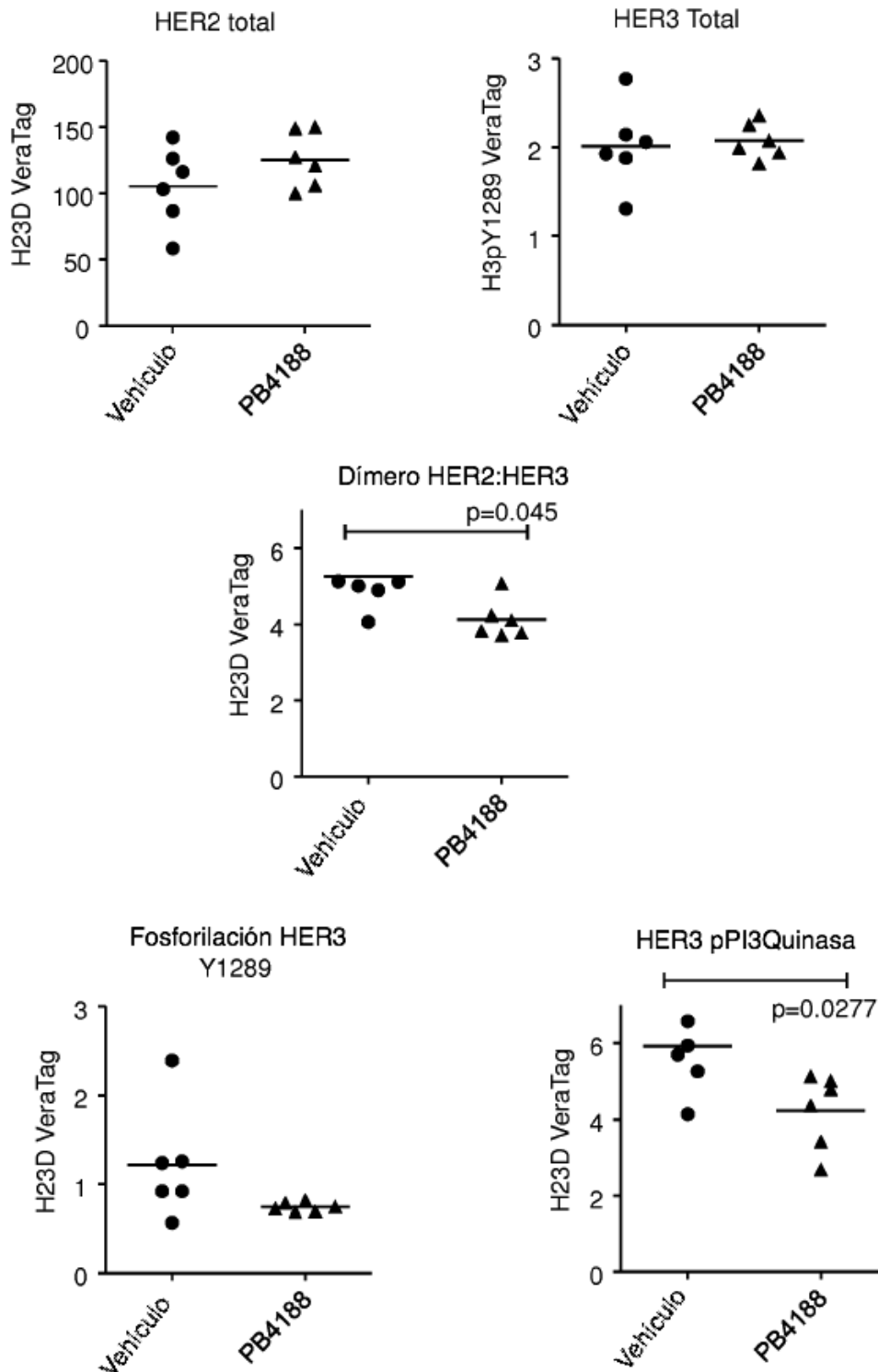


Fig. 33

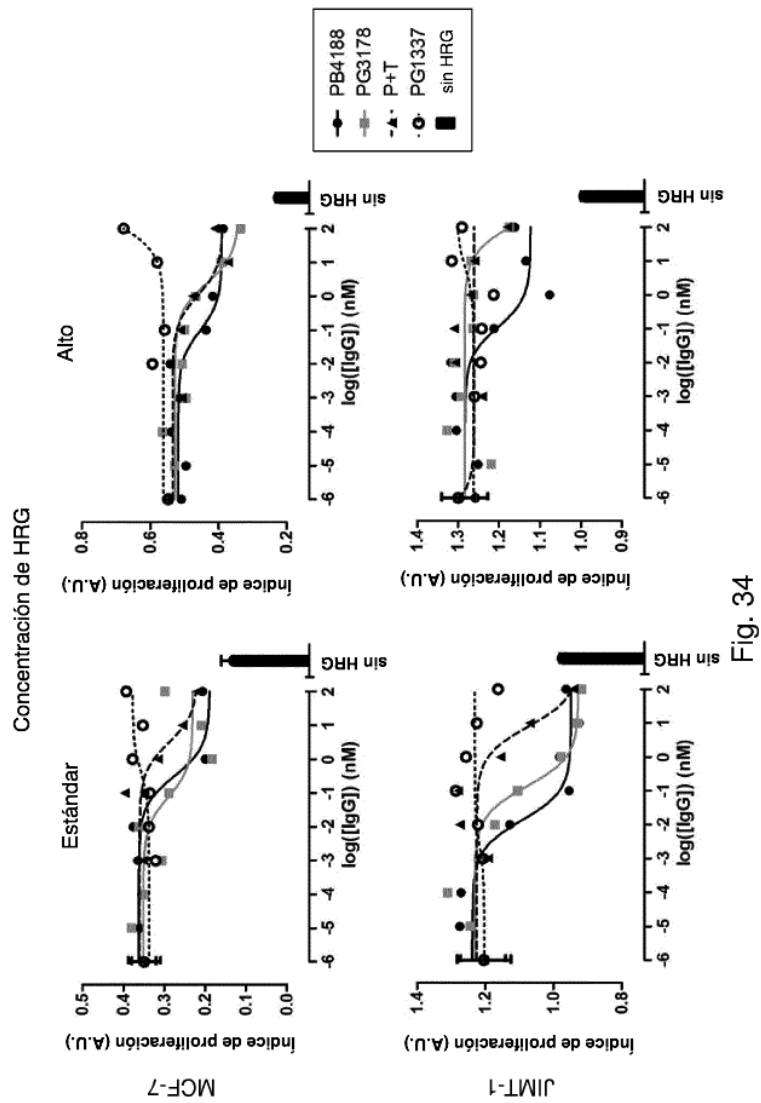


Fig. 34

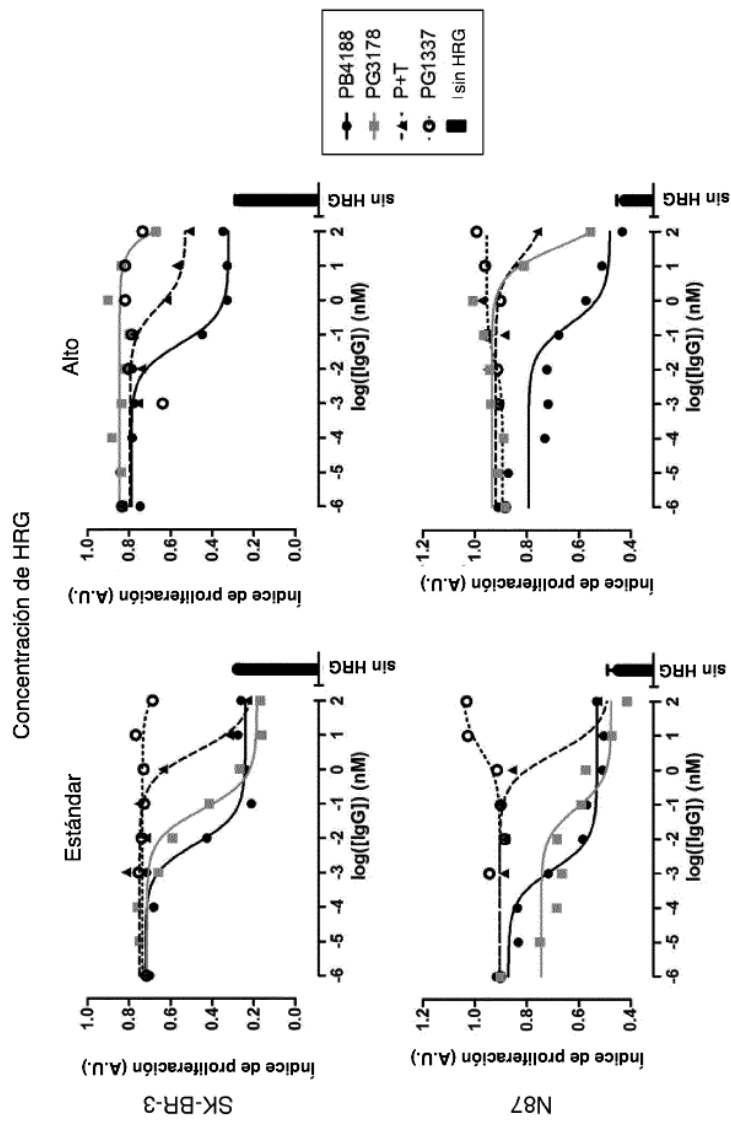


Fig. 34, Continuación

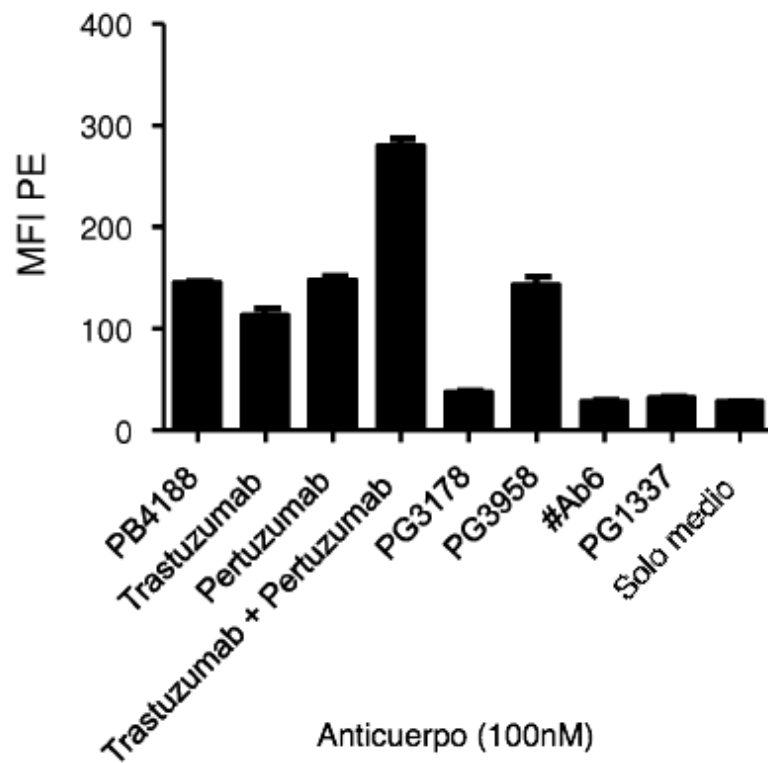


Fig. 35A

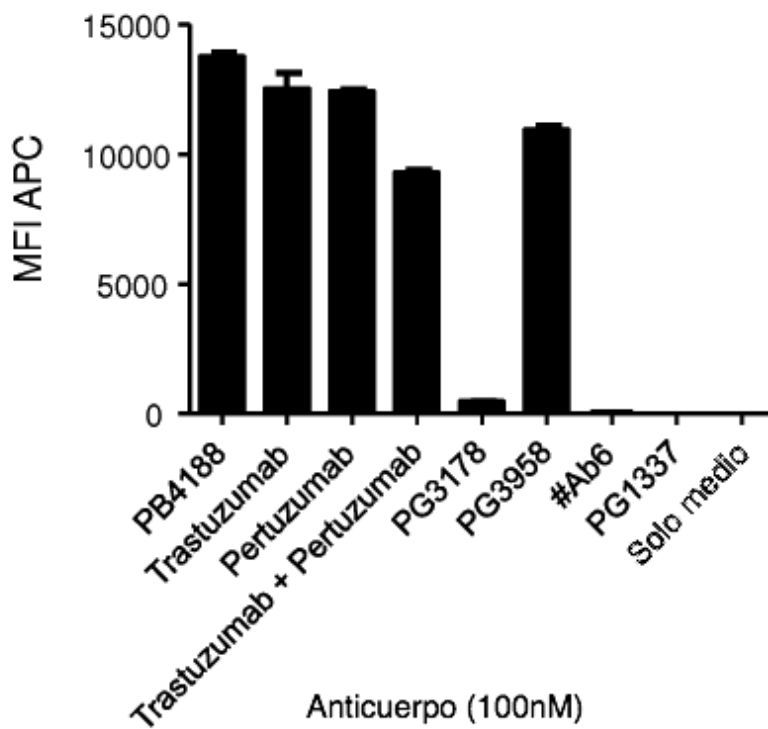


Fig. 35B

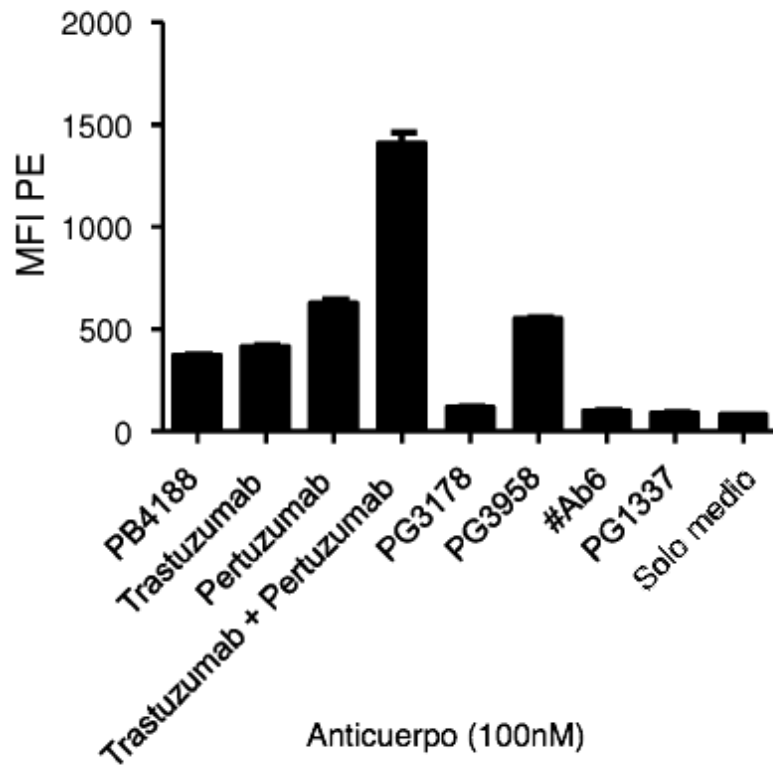


Fig. 35C

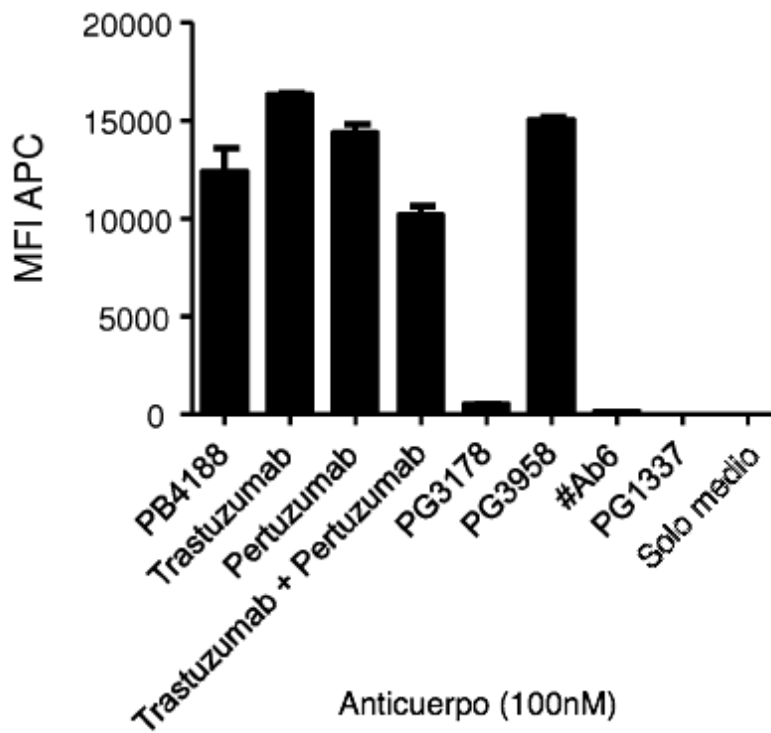


Fig. 35D

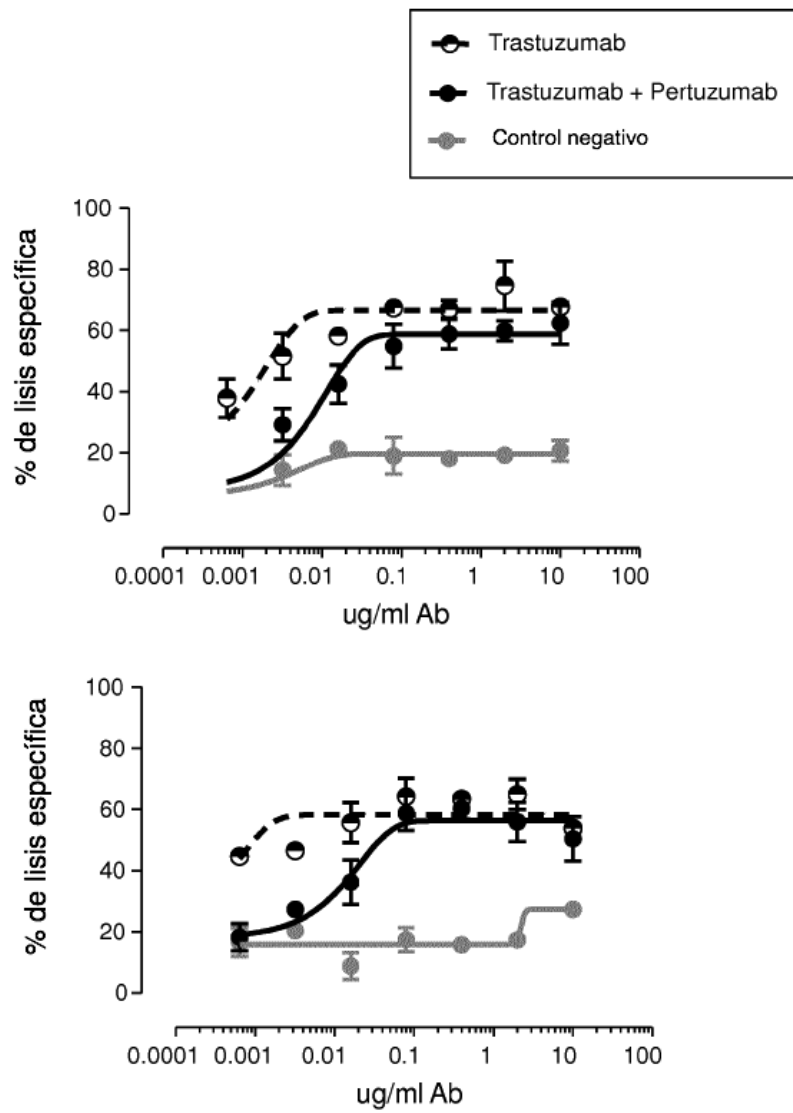


Fig. 36

Fig. 37

Alineación de aminoácidos de variantes MF3178

	CDR1												CDR2											
	1	10	20	30	40	50	60																	
MF3178	QVQLVQSGAE	EVKKPGASVK	V	SCKASGYTF	T	<u>GYMH</u>	WVRQAPGQGLEWMG						<u>WINPNSGGTNYAQKFQG</u>											
MF6055	D.....					A.....							S.....K.....											
MF6056	D.....		T.....			A.....							S.....K.....											
MF6057	D.....		T.....										Q.....											
MF6058	D.....		T.....			A.....							Q.....K.....											
MF6059	D.....												G.....S.....											
MF6060	D.....					A.....							Q.....K.....											
MF6061	D.....												Q.....K.....											
MF6062	D.....												G.....S.....											
MF6063	D.....												Q.....K.....											
MF6064	D.....					K.....							Q.....											
MF6065	D.....					S.....							QG.S.....											
MF6066	D.....												Q.....S.....											
MF6067	D.....												Q.....											
MF6068	D.....												Q.....											
MF6069	D.....												Q.....											
MF6070	D.....					S.....							SG.S.....											
MF6071	D.....												S.....S.....											
MF6072	D.....												S.....											
MF6073	D.....												S.....											
MF6074	D.....												S.....											

	CDR3																							
	70	80	90	100	110	120																		
MF3178	RVITMTRDISISTAY	MELSR	LRSD	DTAVYYCAR	<u>DHGSRRHFWSYWGFDY</u>	WGQGILVTVSS																		
MF6055	E.....T.....			T.....																				
MF6056	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6057	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6058	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6059	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6060	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6061	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6062	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6063	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6064	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6065	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6066	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6067	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6068	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6069	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6070	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6071	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6072	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6073	S.....E.....T.....			Q.....																				
MF6074	S.....E.....T.....			Q.....																				

Fig. 37, Continuación

Alineación de aminoácidos de variantes MF3178 (*sin* extremos de secuencia guía)

```
MF3178 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
MF6058 .....C.....A.G.....
MF6061 .....
MF6065 .....
```

CDR1

```
MF3178 GCTTCTGGATACACCTTCACC GGCTACTATATGCAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG
MF6058 .....CT....
MF6061 .....
MF6065 .....TCT.....
```

CDR2

```
MF3178 AGTGGATGGGA TGGATCAACCCTAACAGTGGTGGGCACAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGC AGGGT
MF6058 .....C.A.....A.....
MF6061 .....C.G.....A.....
MF6065 .....C.GG.G...TCT.....
```

```
MF3178 CACGATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACAC
MF6058 .T.T.....G.....CA.....C.....
MF6061 .....C.....
MF6065 .....C.....TG.....G.....
```

CDR3

```
MF3178 GGCTGTGTATTACTGTGCAAGA GATCATGGTTCTCGTCATTTCTGGTCTTACTGGGGCTTTGATTAT
MF6058 ....AC.....
MF6061 .....
MF6065 .....
```

```
MF3178 TGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTCTCCAGT
MF6058 .....
MF6061 .....
MF6065 .....
```

Fig. 37, Continuación

Secuencias de ADN de variantes MF3178 (sin extremos de secuencia guía)

MF6055

>MF6055_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgacgtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgcgacaggccctggacaagctcttgagtg
gatgggatggatcaacccttctagtgggtggcacaactatgcaaagaagtttcagggcaggggtcacgatg
accagggagacgtccacaagcacagcctacatggagctgagcagggctgagatctgacgacacggctacgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggccttgattattggggccaagg
taccctggtcaccgtctccagt

MF6056

>MF6056_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgacgtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggtcacgtgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgcgacaggccctggacaagctcttgagtg
gatgggatggatcaacccttctagtgggtggcacaactatgcaaagaagtttcagggcaggggtctctatg
accagggagacgtccacaagcacagcctacatgcagctgagcagggctgagatctgacgacacggctacgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggccttgattattggggccaagg
taccctggtcaccgtctccagt

MF6057

>MF6057_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgatgtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggtcacgtgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgcgacaggccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcagagtggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcaggggtcacgatg
accagggacacgtccatcagcacagcctacatgcagctgagcagggctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggccttgattattggggccaagg
taccctggtcaccgtctccagt

MF6058

>MF6058_VH

caggtgcagctggtgcagctctggggctgacgtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggtcacgtgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgcgacaggccctggacaagctcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcaaagtgggtggcacaactatgcaaagaagtttcagggcaggggtctctatg
accagggagacgtccacaagcacagcctacatgcagctgagcagggctgagatctgacgacacggctacgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggccttgattattggggccaagg
taccctggtcaccgtctccagt

Fig. 37, Continuación

MF6059

```
>MF6059_VH
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatgcaactgggtgcgacaggccctggacaagggttgagtg
gatgggatggatcaaccctggcagtggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctggtcacctctccagt
```

MF6060

```
>MF6060_VH
caggtgcagctggtgcagctctggggctgacgtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatgcaactgggtgcgacaggccctggacaagctcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcaaagtggtggcacaactatgcaagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggagacgtccacaagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctacgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctggtcacctctccagt
```

MF6061

```
>MF6061_VH
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatgcaactgggtgcgacaggccctggacaagggttgagtg
gatgggatggatcaaccctcagagtggtggcacaactatgcacagaagtttaagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctggtcacctctccagt
```

MF6062

```
>MF6062_VH
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatgcaactgggtgcgacaggccctggacaagggttgagtg
gatgggatggatcaaccctggcagtggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccacaagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctggtcacctctccagt
```

Fig. 37, Continuación

MF6063

```
>MF6063_VH
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatgactgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcagagtgggtggcacaactatgcaaagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcaggtgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctggtcaccgtctccagt
```

MF6064

```
>MF6064_VH
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatgactgggtgcgacagggccctggaaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcagagtgggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcaggtgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctggtcaccgtctccagt
```

MF6065

```
>MF6065_VH
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccctcttactatgactgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcaggggggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagctgtacatggagctgagcaggtgagatctgaggacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctggtcaccgtctccagt
```

MF6066

```
>MF6066_VH
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatgactgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcagagtgggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagctctctgagatctgaggacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctggtcaccgtctccagt
```

Fig. 37, Continuación

MF6067

```
>MF6067_VH
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcagagtgggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagctctacatggagctgagctctctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctgggtcacctctccagt
```

MF6068

```
>MF6068_VH
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcagagtgggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcagggctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctgggtcacctctccagt
```

MF6069

```
>MF6069_VH
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctcagagtgggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcagggctgagatctgacgacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctgggtcacctctccagt
```

MF6070

```
>MF6070_VH
caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcacctcttactatatgcaactgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctctctgggggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccaccagcacagtgatgagctgagcagggctgagatctgaggacacggctgtgt
attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggctttgattattggggccaagg
taccctgggtcacctctccagt
```

Fig. 37, Continuación

MF6071

>MF6071_VH

cagggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggtctcctgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgcgacagggccctggacaagggttgagtg
 gatgggatggatcaacccttctagtgggttctacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
 accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagctctctgagatctgagacacggctgtgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggctttgattattggggccaagg
 taccctgggtcaccgtctccagt

MF6072

>MF6072_VH

cagggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggtctcctgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgcgacagggccctggacaagggttgagtg
 gatgggatggatcaacccttctagtgggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
 accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagctctctgagatctgacgacacggctgtgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggctttgattattggggccaagg
 taccctgggtcaccgtctccagt

MF6073

>MF6073_VH

cagggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggtctcctgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgcgacagggccctggacaagggttgagtg
 gatgggatggatcaacccttctagtgggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
 accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcaggtgagatctgacgacacggctgtgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggctttgattattggggccaagg
 taccctgggtcaccgtctccagt

MF6074

>MF6074_VH

cagggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggtctcctgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgcgacagggccctggacaagggttgagtg
 gatgggatggatcaacccttctagtgggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
 accagggacacgtccaccagcacagcctacatggagctgagcaggtgagatctgacgacacggctgtgt
 attactgtgcaagagatcatggttctcgtcatttctgggtcttactggggctttgattattggggccaagg
 taccctgggtcaccgtctccagt

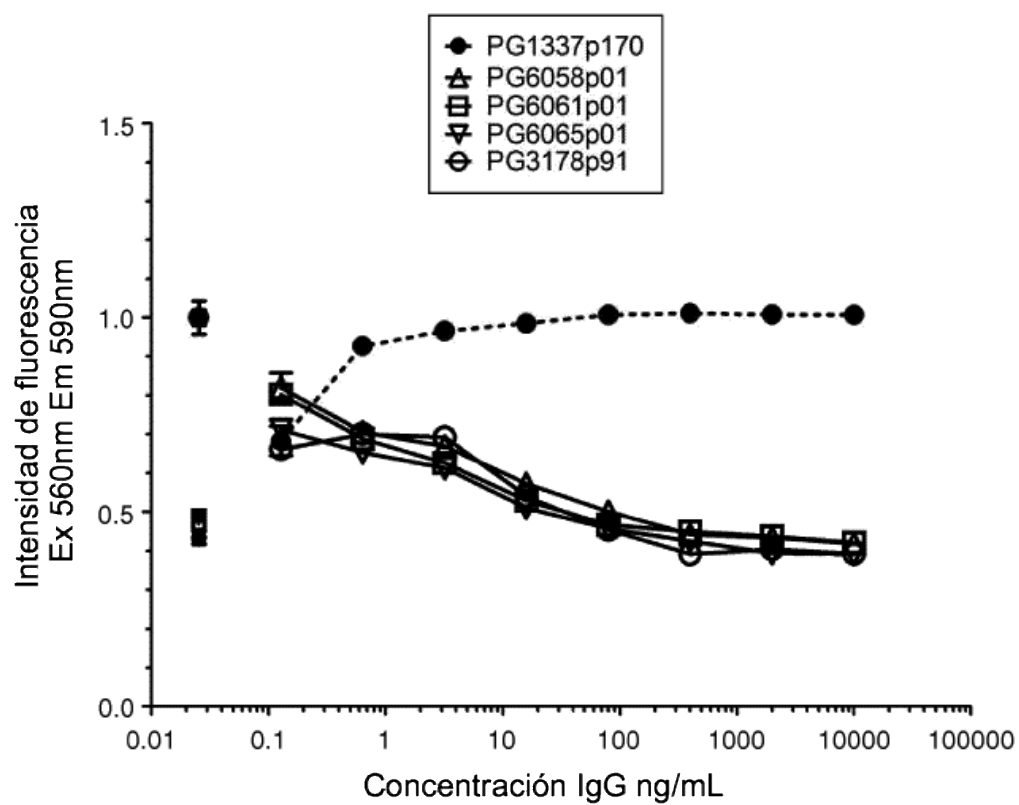


Fig. 38

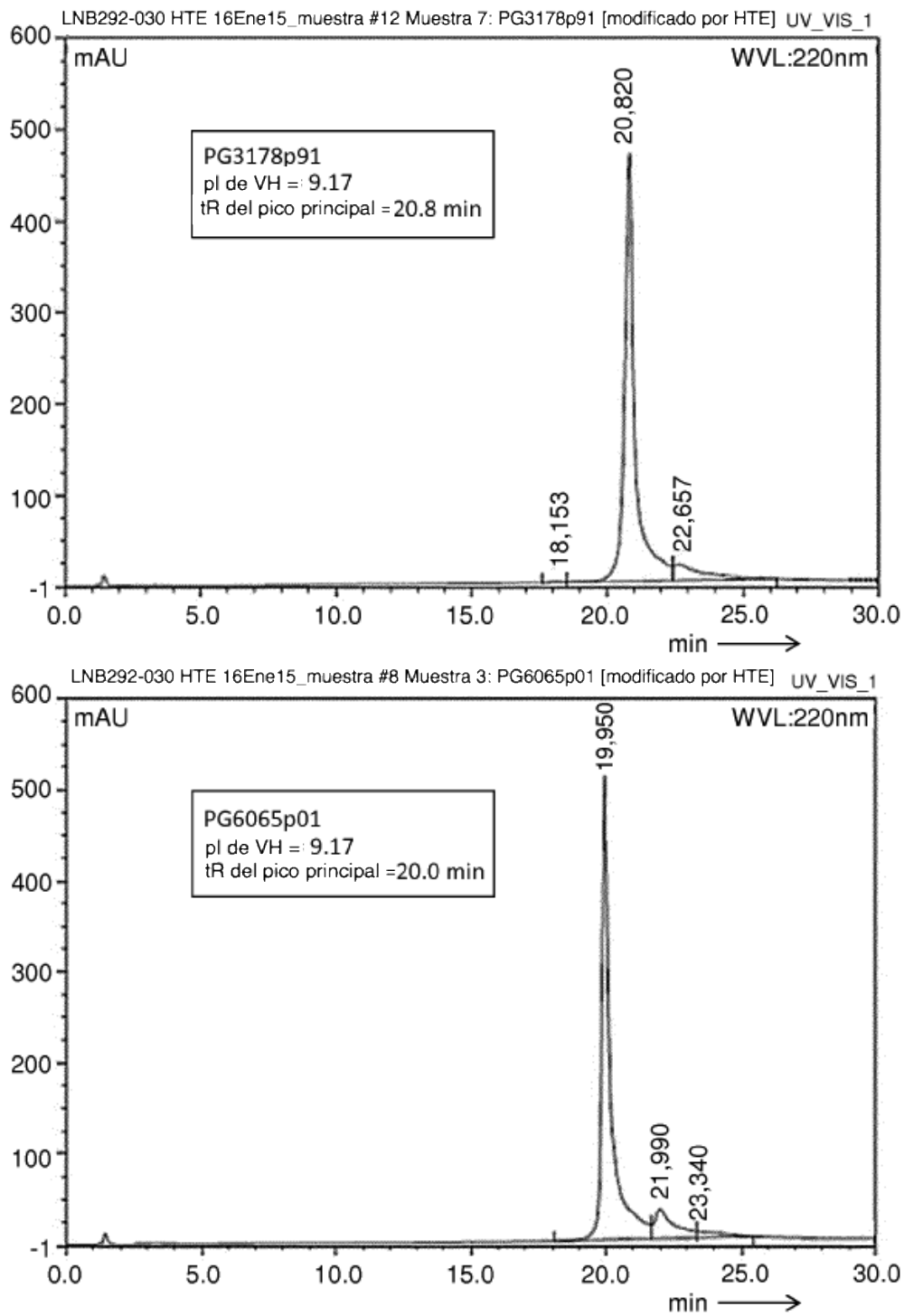


FIG. 39

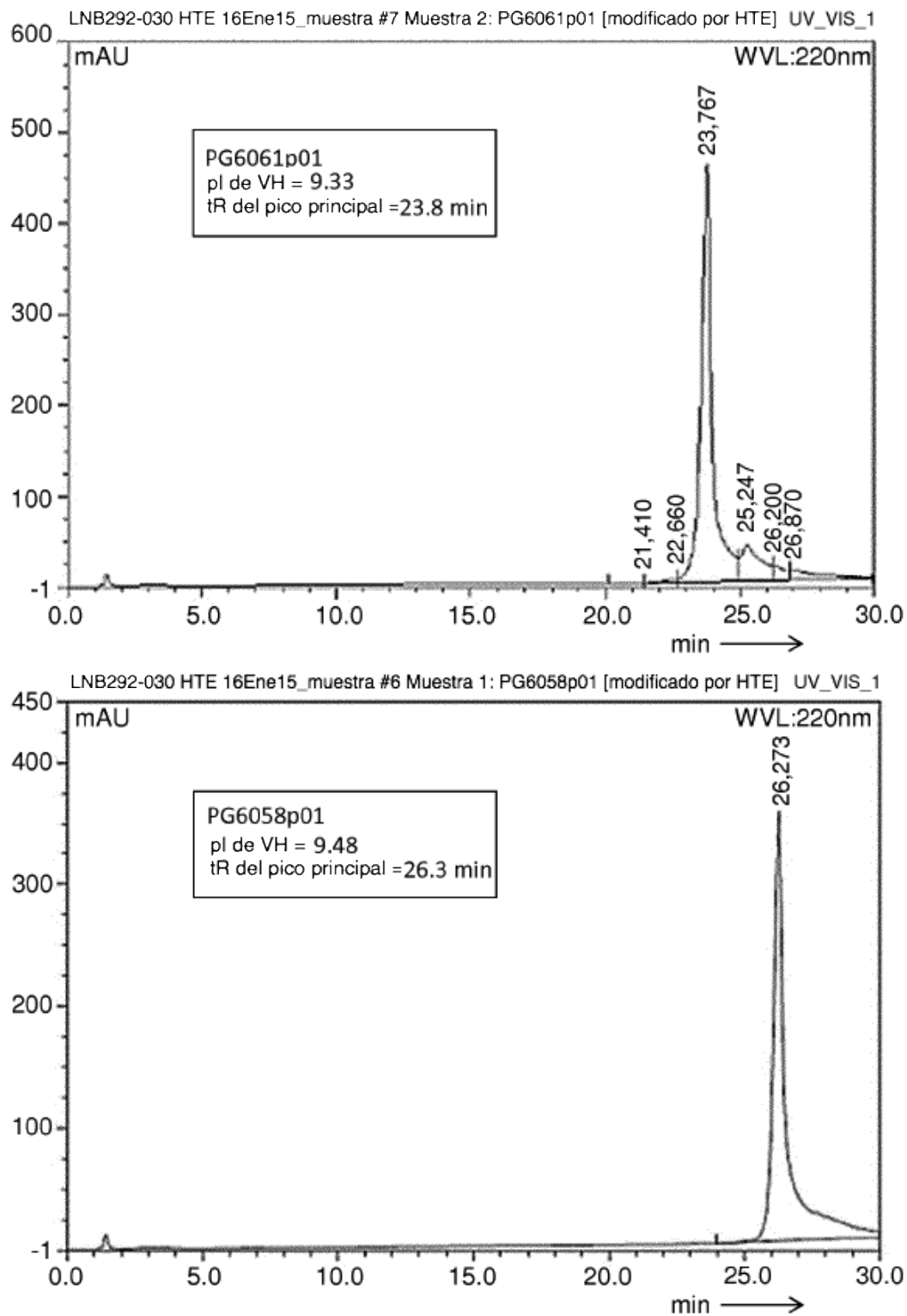


FIG. 39, Continuación

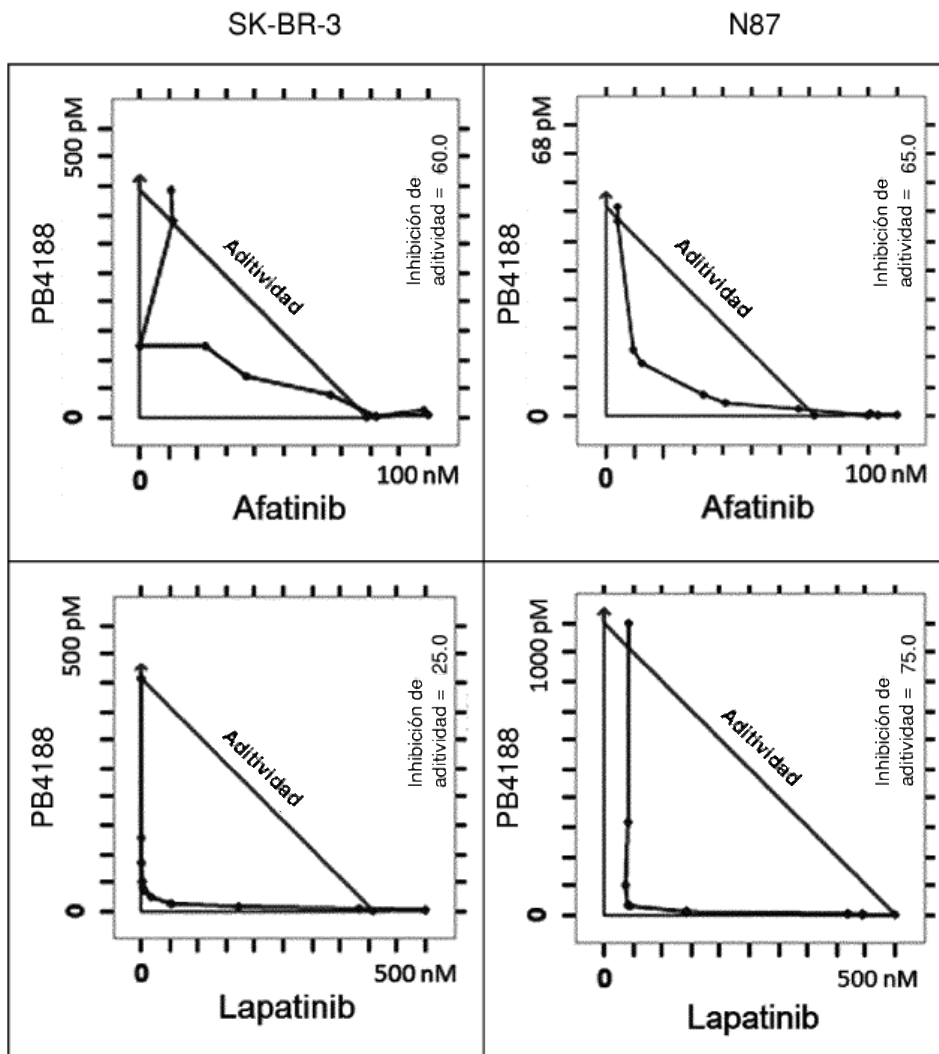


Fig. 40A

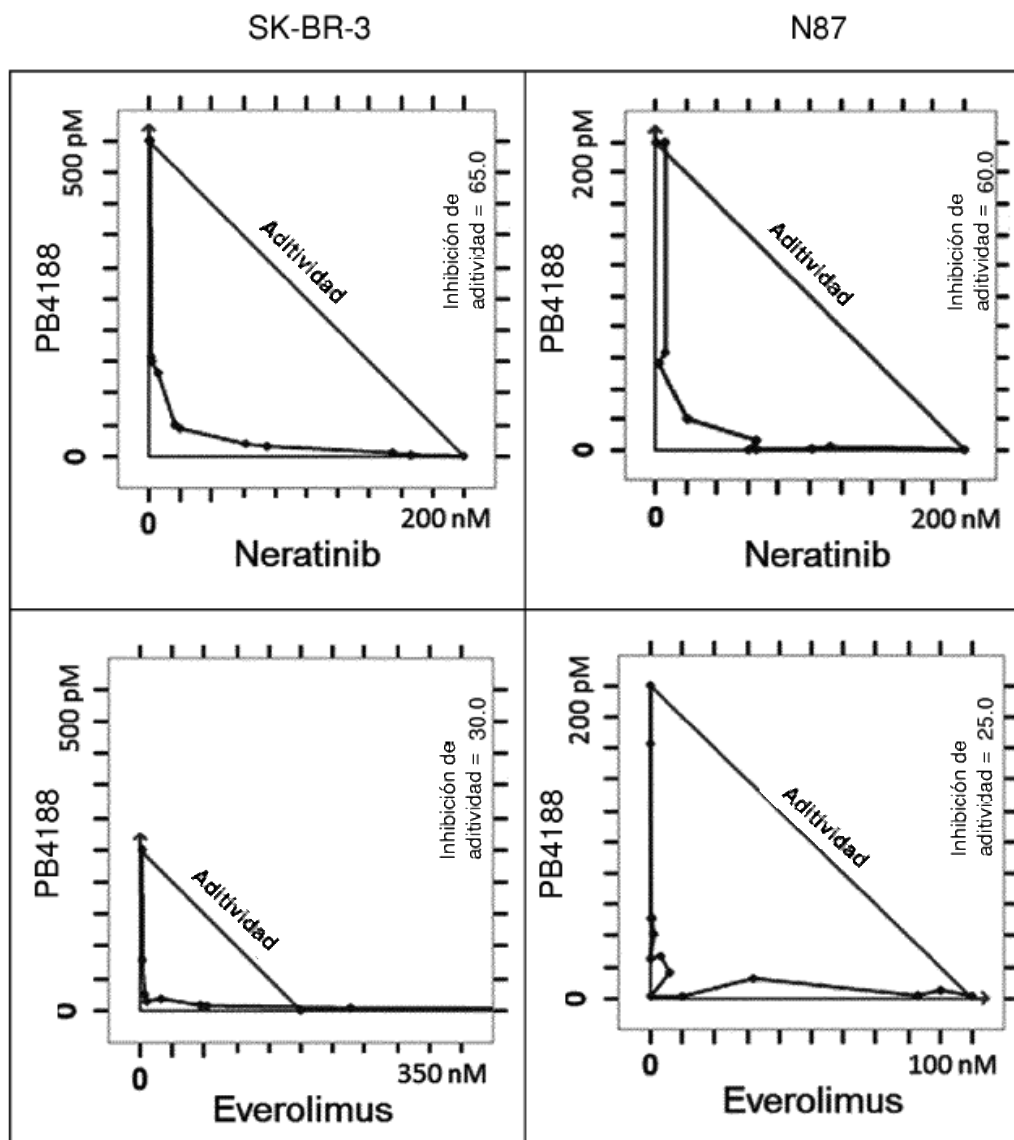


Fig. 40A, Continuación

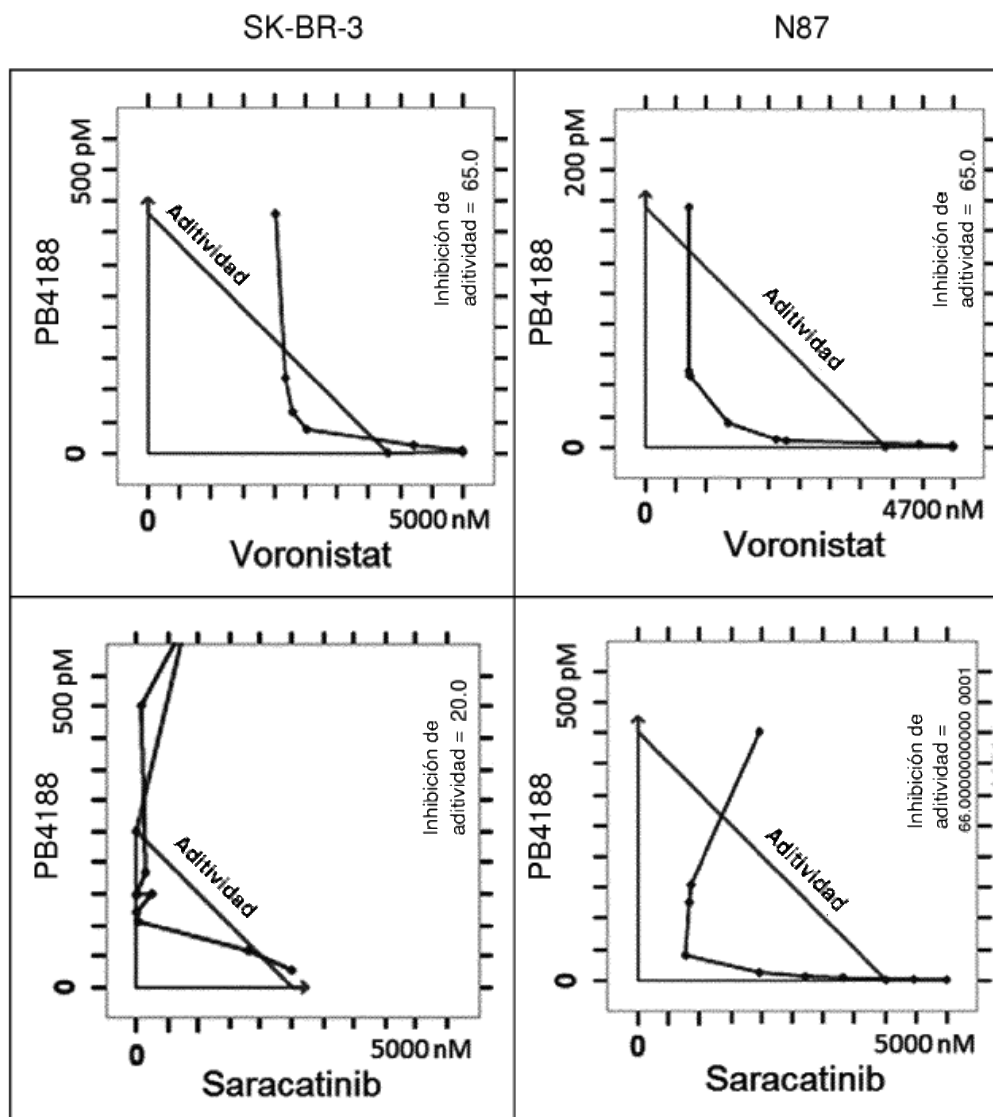


Fig. 40A,Continuación

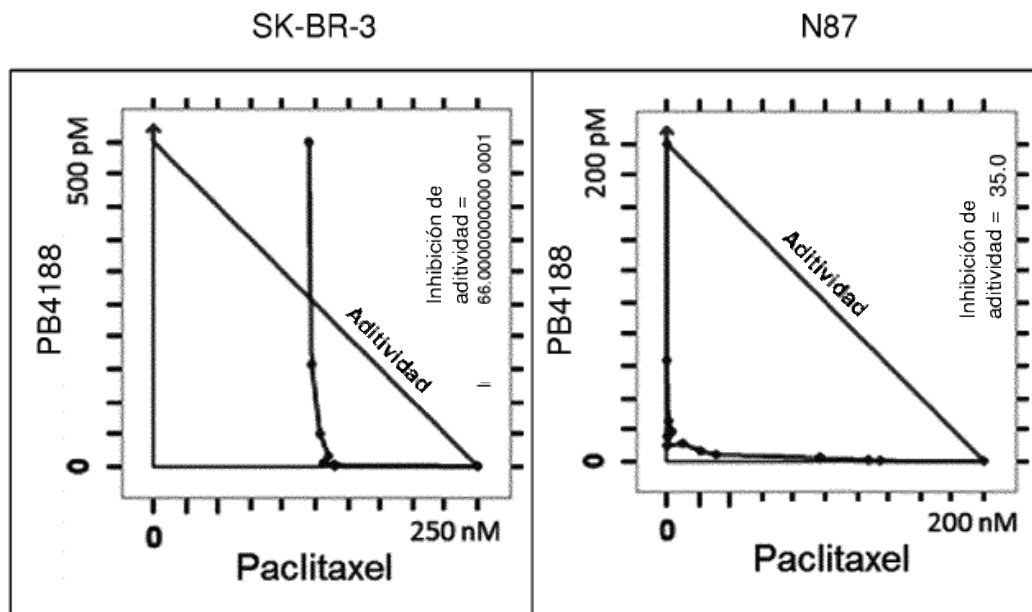


Fig. 40A, Continuación

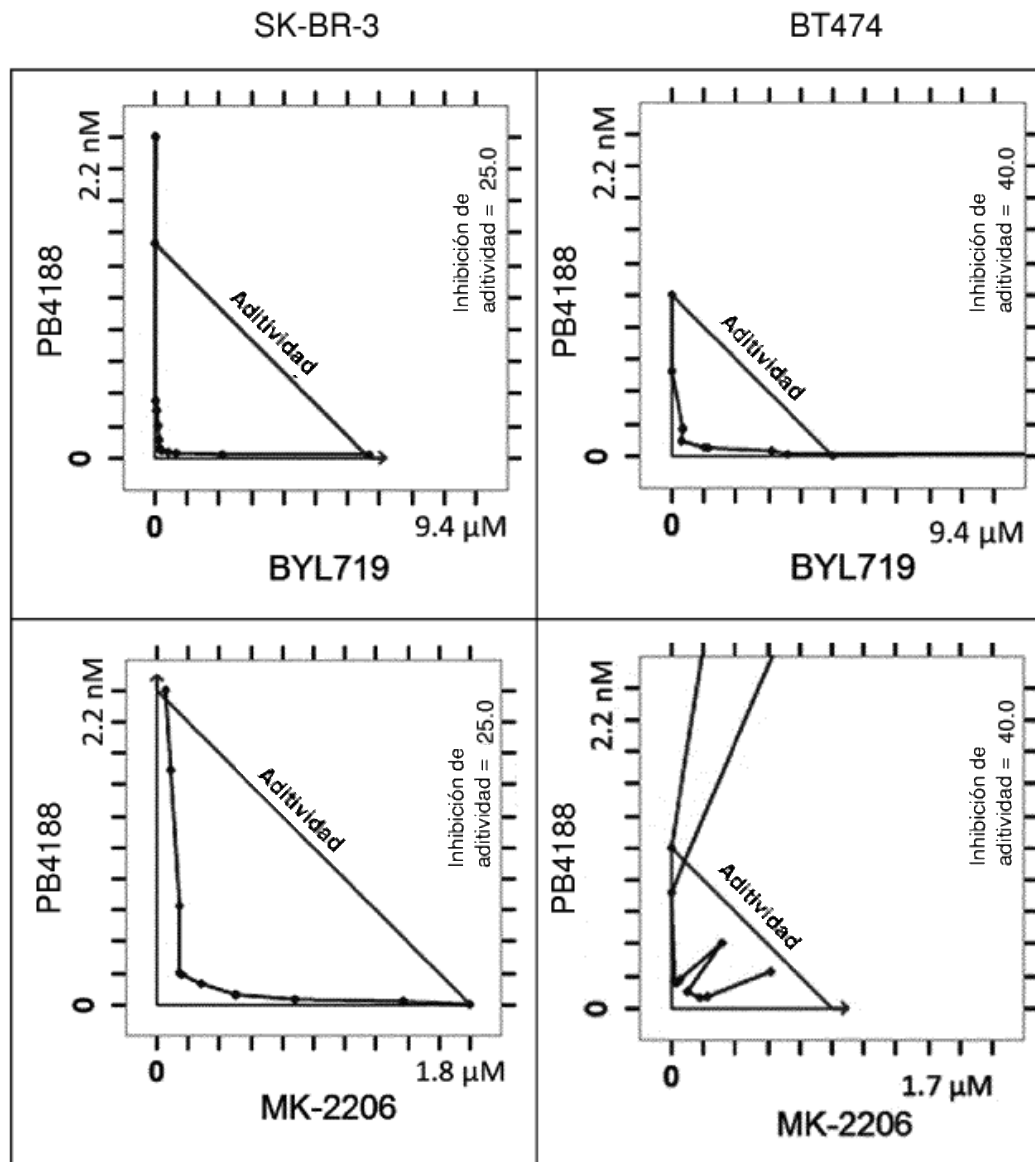


Fig. 40B